

БИОКОНВЕРСИЯ ВОЗОБНОВЛЯЕМОЙ РАСТИТЕЛЬНОЙ БИОМАССЫ НА ПРИМЕРЕ БИОТОПЛИВА ВТОРОГО ПОКОЛЕНИЯ: СЫРЬЁ, ПРЕДОБРАБОТКА, ФЕРМЕНТЫ, ПРОЦЕССЫ, ЭКОНОМИКА

©2021 г. А.П.СИНИЦЫН^{1,2*}, О.А.СИНИЦЫНА²

¹Институт биохимии им. А.Н.Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва

²Химический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова, Москва

I. Введение. II. Виды, запасы и состав возобновляемой растительной биомассы (ВРБ). III. Предварительная обработка ВРБ. IV. Реакционная способность первичных и предобработанных видов ВРБ. V. Ферментативный гидролиз ВРБ и возможности увеличения его эффективности. VI. Продуценты ферментов для конверсии ВРБ. VII. Технологии получения биоэтанола. VIII. Примеры масштабирования процессов получения биоэтанола. IX. Экономический анализ процессов получения биоэтанола. X. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Возобновляемая растительная биомасса (ВРБ) составляет большую часть органического материала на Земле и является практически неисчерпаемым источником сырья и энергии, основными её компонентами

Принятые сокращения: AFEX – ammonia fiber explosion; ARP – ammonia recycle percolation; CBP – consolidated bioprocess; HHF – hybrid hydrolysis and fermentation; MESP – minimum ethanol selling price; SHF – separate hydrolysis and fermentation; SSF – simultaneous saccharification and fermentation, а.к. – аминокислота; а.о. – аминокислотный остаток; БГ – β -глюкозидаза; ВРБ – возобновляемая растительная биомасса; ВС – восстанавливающие сахара; ИЖ – ионная жидкость; ИК – индекс кристалличности; КД – каталитический домен; КС – коэффициент синергизма; ММ – молекулярная масса; ПМО – полисахаридмонооксигеназа; РС – реакционная способность; с.в. – сухое вещество; СП – степень полимеризации; ЦБГ – целлюбиогидролаза; ЦСД – целлюлозосвязывающий домен; ЭГ – эндо- β -1,4-глюканаза.

* Адрес для корреспонденции: apsinitsyn@gmail.com

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ.

являются целлюлоза, гемицеллюлозы и лигнин. Общее количество ВРБ на земном шаре составляет более 1800 млрд т с ежегодным приростом от 130 до 200 млрд т, из которых порядка 40 млрд т составляет древесина. Отходы сельскохозяйственных, целлюлозно-бумажных и деревообрабатывающих производств в мире превышают 3,5 млрд т в год. Отметим, что разведанные запасы нефти на Земле в настоящее время оцениваются примерно в 250–500 млрд т, природного газа – в 187 трлн м³, угля – в 892 млрд т. Невозобновляемые ископаемые источники сырья будут исчерпаны, и вопрос состоит лишь в сроках (нефть ~50 лет, природный газ ~60 лет, каменный уголь ~200 лет) [1–5].

Переработка ископаемых видов сырья ведет к загрязнению окружающей среды и изменению климата [6]. Скорость глобального потепления достигла $0,20 \pm 0,05^\circ\text{C}$ в год [7] и продолжает увеличиваться из-за возрастающей интенсивности промышленных процессов, изменение климата еще более усиливается выбросом в атмосферу парниковых газов (CO_2 , N_2O и метан), образующихся в процессе сжигания ископаемого топлива [8]. Глобальное потепление уже вызвало таяние льдов на Северном полюсе и повышение уровня мирового океана, которое может привести к затоплению прибрежных районов и сокращению площади суши, сокращению пищевых ресурсов и запасов пресной воды из-за засоления грунтовых вод [9].

Альтернативным источником энергии, оказывающим менее отрицательное воздействие на окружающую среду, может стать биотопливо, получаемое из ВРБ – биоэтанол, а также биобутанол и биодизель. Кроме того, биотехнологическая переработка ВРБ позволяет получать разнообразные коммерчески востребованные продукты – этилен, этиленгликоль, этаноламин, органические кислоты, аминокислоты, сахарные спирты, диолы, фураны, сложные эфиры, алкены, алканы, акрилаты, полимеры (включая биodeградебельные), смолы, кормовые продукты. Освоение возобновляемых источников сырья позволяет получать разнообразные химические соединения, традиционно извлекаемые из нефти, это привело к идеям перехода «от углеводородов к углеводам» и «от нефтефабрики к биофабрике». Замена веществ, получаемых нефтехимическим синтезом, продуктами биотехнологии является важной частью современных стратегий устойчивого развития и биоэкономики [10–17].

В настоящем обзоре на примере процессов получения этанола из целлюлозы (биотоплива 2 поколения) рассмотрены возможности переработки ВРБ. 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 этанол, выделение этанола, а также утилизацию отходов.

II. ВИДЫ, ЗАПАСЫ И СОСТАВ ВРБ

Отходы от заготовки и переработки древесины представляют собой одну из основных групп доступной ВРБ. Ежегодный сбор древесной биомассы в мире для получения пиломатериалов и выработки целлюлозы составляет 960 млн т, в России – около 200 млн т (соотношение хвойной к лиственной древесине примерно 3 : 1). Древесное сырье теряется при лесопилении, деревообработке и химической переработке. В России в качестве сырья для биоконверсии могут использоваться отходы переработки лиственных пород древесины, в первую очередь древесный опил, так как существует развитая инфраструктура сбора и переработки данного вида сырья на ЦБК и фанерных заводах, а также имеется в наличии серьезная проблема утилизации отходов этих производств. В целом, в России отходы лесозаготовок составляют 40–60% от заготавливаемой древесины.

Вторая группа ВРБ – сельскохозяйственные отходы, состоящие в основном из однолетней биомассы (солома, стебли, шелуха, початки, кожура, листья). Мировое производство растительных остатков сельскохозяйственных культур составляет около 3,4 млрд т в год (по с.в.), включая 100 млн т кукурузных стеблей и около 350 млн т пшеничной соломы. В России перспективным сырьем для биоконверсии могут быть солома и свекловичный жом. Российский агропромышленный комплекс ежегодно производит 260 млн т отходов (по с.в.). Из них 150 млн т приходится на растениеводство и 14 млн т – на отходы перерабатывающей промышленности. Выход нетоварной части зерновых культур составляет 120–150% для пшеницы, овса и ячменя, 160–200% для ржи, 250% для кукурузы, для подсолнечника – 280% от объемов урожая товарной части полевых культур. Основной объем сахарной свеклы, выращиваемой в России, перерабатывается на сахарных заводах. Средний выход сахара при переработке сахарной свеклы составляет 10–12%, при этом образуется 80–84% сырого свекловичного жома, богатого полисахаридами. Общий объем производства сырого свекловичного жома составляет около 30 млн т [2].

ВРБ состоит в основном из целлюлозы (30–50%), гемицеллюлоз (25–30%), некоторых других полисахаридов (крахмала, пектинов, инулина и т.д.), лигнина (15–25%), а также белков и зольных веществ.

Её состав варьирует в зависимости от генотипа растений, условий окружающей среды и вида растительных тканей [9]. В большем количестве целлюлоза содержится в продуктах и отходах целлюлозно-бумажной промышленности, лубяных волокнах таких растений, как лён и рами (80–90%), в волокнах хлопка (96–99%) [18]. В табл. 1 представлен состав различных видов ВРБ.

По молекулярному строению целлюлоза представляет собой линейный полимер, состоящий из остатков глюкозы, соединенных β -1,4-D-глюкозидными связями. Степень полимеризации (СП) нативной целлюлозы составляет от 10 тыс. в древесине до 15 тыс. в хлопке [23], а молекулярная масса (ММ) – более 1,5 млн Да [24]. Целлюлоза, благодаря своим химическим и физическим свойствам, а также надмолекулярной структуре, выполняет функцию основного структурного компонента клеточных стенок растений. Микрофибриллы целлюлозы, состоящие из полимерных цепей в кристаллической решетке, окружены матрицей из гемицеллюлоз и лигнина [25]. Макромолекулы целлюлозы агрегированы в пучки (микрофибриллы) и формируют однородные высокоупорядоченные кристаллические зоны (кристаллиты), которые чередуются с неоднородными, менее упорядоченными аморфными зонами, содержание которых в нативной целлюлозе составляет 10–15% [26]. В кристаллических зонах существует трехмерный дальний порядок расположения цепей целлюлозы, в аморфных зонах дальний порядок отсутствует, сохраняется лишь общая продольная направленность цепей. В аморфных участках целлюлоза более доступна для действия химических веществ или ферментов, чем в кристаллических [27]. Макромолекулы целлюлозы характеризуются индексом (степенью) кристалличности (ИК). Этот показатель отражает плотность упаковки целлюлозы и соотношение аморфных и кристаллических участков в ее структуре. От величины ИК обратно пропорционально зависит эффективность ферментативного гидролиза целлюлозы [28].

Гемицеллюлозы представляют собой гетерополимеры гексоз (D-маннозы, D-глюкозы, D-галактозы) и пентоз (D-ксилозы, L-арабинозы). В зависимости от источника ВРБ в состав гемицеллюлоз могут входить D-глюкуроновая кислота, её 4-O-метилловый эфир, феруловая и *n*-кумаровая кислоты, а также присоединенные через сложноэфирные связи остатки уксусной кислоты. Гемицеллюлозы могут иметь линейную или разветвленную структуру, боковые группы гемицеллюлоз делает их некристаллическими или слабо кристаллическими. СП гемицеллюлоз составляет 50–200, что значительно меньше СП целлюлозы [29, 30].

Таблица 1. Содержание целлюлозы, гемицеллюлоз и лигнина в различных видах возобновляемой растительной биомассы (в процентах от с.в.) [по 19–22]

ВРБ / Компонент	Целлюлоза	Гемицеллюлозы	Лигнин
Твердые породы древесины			
Белая береза	41	36	19
Тополь, осина	50–53	26–29	15–16
Красный клен	44	29	24
Мягкие породы древесины			
Сосна	42–43	18–25	29–30
Пихта	44	27	28
Агропромышленные отходы			
Пшеничная солома	33–50	24–36	9–17
Рисовая солома	36–47	19–25	10–24
Ячменная солома	34–38	22–25	14–16
Свекловичный жом	41	23	18
Кукурузные стебли	35–40	17–35	7–18
Стебли хлопчатника	38–43	21–34	22
Стебли сахарного тростника (багасса)	32–44	27–32	19–24
Стебли сои	35	25	20
Стебли проса	45	32	12–20
Оболочки сои	19–51	10–25	1–4
Оболочки люпина	36	1	1
Хлопковая шелуха	31	25	31
Рисовая шелуха	28	18	19
Овсяная шелуха	29	34	17
Подсолнечная лузга	23	18	29
Пустые плодовые гроздья пальмы	30	25	25
Продукты и отходы целлюлозно-бумажной промышленности			
Целлюлоза хвойная белёная	81	14–15	–
Целлюлоза хвойная небелёная	80	13–14	3
Целлюлоза лиственная белёная	76	22	–
Целлюлоза лиственная небелёная	75	22	2
Отходы переработки целлюлозы	60–70	10–20	5–10
Газетная бумага	40–55	25–40	18–30

Функциональная роль гемицеллюлоз заключается в объединении полимерных компонентов растений в клеточные стенки. Гемицеллюлозы образуют переходный слой между целлюлозой, с которой они связываются посредством водородных связей, и лигнином, с которым они связаны ковалентно за счёт дикумаровых мостиков между лигнином и ксиланом.

Гемицеллюлозы классифицируются по сахару, составляющему основную цепь полимера – к ним относятся ксиланы (наиболее распространённый класс), галактоглоукоманнаны и ксилоглоуканы [30–33]

Арабиноглоукуроноксиан (арабиноксиан) – гетерополисахарид, составляющий 7–8% с.в. мягкой (хвойной) древесины. Основная цепь его построена из 1,4-β-D-ксилопиранозных звеньев, а боковые группы представляют собой 4-O-метил-D-глоукуроновую кислоту (α-1,2-связь, степень замещения 20%) и L-арабинофуранозу (α-1,2 и α-1,3-связь, 10–15%). Ацетилглоукуроноксиан (глоукуроноксиан) – основной ксилан твердых (лиственных) пород деревьев. Содержание его варьирует от 15 до 30% от с.в. древесины. В основной цепи глоукуроноксиан содержит D-ксилопиранозные остатки, соединенные β-1,4-связями, 70% которых ацетилировано по C-2 или C-3 углеродным атомам. Кроме того, в среднем к каждому десятому ксилозному звену в качестве боковой группы присоединена α-1,2-связью молекула 4-O-метил-D-глоукуроновой кислоты [33].

Галактоглоукоманнан – преобладающий компонент гемицеллюлоз мягких (хвойных) пород деревьев. Основная цепь галактоглоукоманнана сформирована β-1,4-связанными остатками D-маннопиранозы и D-глоукопиранозы, которые чередуются произвольным образом, а боковые цепи – остатками D-галактозы, соединенной с основной цепью α-1,6-связью. Кроме того, в среднем каждый четвертый гликозидный остаток основной цепи ацетилирован по C-2 или C-3 атомам. Выделяют два типа галактоманнанов – с высоким и низким содержанием галактозы. Первый, составляющий 5–8% от сухой массы хвойной древесины, характеризуется соотношением галактоза : глюкоза : манноза как 1 : 1 : 3, во второй, составляющий 10–15% от сухой массы хвойной древесины – как 0,1 : 1 : 3 [33].

Ксилоглоукан – полисахарид, состоящий в основном из D-глоукозы и D-ксилозы в соотношении примерно 4 : 3, а также меньших количеств D-галактозы; часто содержит также остатки L-фукозы и L-арабинозы. Основная цепь ксилоглоуканов состоит из β-1-4-связанной D-глоукопиранозы, как и в случае целлюлозы. К каждому трем (иногда – двум) из четырех остатков глоукозы присоединены единичные остатки D-ксилопиранозы с помощью α-1-6-связей. Боковые группы

наиболее распространенного типа ксилоглюкана распределены упорядоченно – три заместителя подряд, затем пропуск. Часть остатков ксилозы содержит заместители – D-галактопиранозу, присоединенную β -1-2-связями, некоторые остатки галактопиранозы дополнительно содержат L-фукопиранозильные заместители, присоединенные α -1-2-связями. Таким образом, основной структурный мотив ксилоглюкана – гептасахарид Xyl_3Glc_4 [34, 35].

Лигнин представляет собой смесь ароматических полимеров фенольной природы, построенных из мономерных звеньев, называемых фенилпропановыми структурными единицами, предшественниками которых служат *m*-кумаровый, кониферилловый и синаповый спирты. У лигнина отсутствует единый тип связи между мономерными звеньями. Кроме углерод-кислородных связей C–O–C присутствуют и углерод-углеродные связи C–C между звеньями, характерные для карбоцепных полимеров [18]. Средняя ММ выделенных из растений лигнинов составляет 1–20 тыс. Да, СП природных лигнинов трудно определить из-за сложного строения. Лигнин более устойчив к биологическому воздействию, чем полисахариды [31].

III. ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ОБРАБОТКА ВРБ

В изначальном виде ВРБ малоприспособлена для ферментативной деструкции вследствие низкой реакционной способности (РС) [32, 36]. Лигнин является главным защитным средством для растения, препятствующим деструкции полисахаридов ферментами [37, 38], он является физическим барьером, препятствующим их действию; помимо этого на лигнине происходит непродуктивная адсорбция ферментов.

Целлюлоза устойчива к действию ферментов из-за своей нерастворимости и прочной структуры, обусловленной высокой кристаллическостью [39–41]. Гемичеселлюлозы в виде лигно-углеводных комплексов также вносят вклад в низкую реакционную способность ВРБ [42–46].

В целом, факторы, которые способствуют устойчивости ВРБ к воздействию ферментов включают высокие ИК и СП целлюлозы; ограниченную площадь поверхности, доступной для атаки ферментов; высокую степень экранирования целлюлозы лигнином; высокую степень «оборачивания» целлюлозы гемичеселлюлозами.

Низкая реакционная способность ВРБ является очень существенным негативным фактором, препятствующим практическому воплощению процессов биорефайнинга. Для увеличения РС при

ферментативной конверсии необходима предварительная обработка ВРБ, основными задачами которой является удаление лигнина и разрушение структуры целлюлозных волокон – это сопровождается снижением ИК и СП целлюлозы, уменьшением размера частиц сырья, увеличением пористости и доступной ферментам поверхности [43–48]. Существуют разные методы предобработки, основанные на использовании различных принципов воздействия на ВРБ: механические, физические, химические, физико-химические, биологические [15, 49].

МЕХАНИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Измельчение

Измельчение является распространённым видом предобработки ВРБ [50], оно приводит к получению фрагментов сырья с малым размером частиц, увеличенной проницаемостью его структуры и снижению ИК целлюлозы [51]. Разрушения ВРБ происходит за счёт действия сил трения, сдвига, сжатия, удара [49]. Дисковые мельницы (влажное измельчение) нашли широкое применение для предобработки ВРБ из-за относительно низкого энергопотребления [52]. Кроме того, применяются молотковые, шаровые и, более экономичные, шаровые вибрационные мельницы [15]. В зависимости от размера получаемых частиц виды измельчения подразделяются на дробление (несколько см), измельчение (1 см – 500 мкм), микронизацию (500–100 мкм), тонкое измельчение (менее 100 мкм), ультратонкое измельчение (менее 30 мкм) [53]. Размер частиц используется для первичного определения эффективности измельчения: уменьшение размера частиц ВРБ до 500 мкм ещё не оказывает влияние на скорость ферментативного гидролиза целлюлозы (хотя облегчает процессинг ВРБ). Заметное увеличение РС наблюдается при уменьшении размера части до 20–50 мкм.

В целом измельчение (как сухое, так и влажное) является весьма эффективным методом предобработки для многих видов ВРБ с точки зрения увеличения их РС, кроме того измельчение является одним из наиболее экологически дружественных видов предобработки. Факторами, ограничивающими применение методов измельчения, являются высокие энергозатраты, относительно низкая производительность и необходимость интенсивного теплоотвода, в особенности при глубоком измельчении ВРБ.

Экструзия

Экструзия подразумевает нагрев, перемешивание и сдвиговое воздействие на ВРБ, что приводит к удалению лигнина и уменьшению ИК целлюлозы. Эффективность процесса экструзии зависит от конфигурации, числа, скорости и направления вращения шнеков, характера экструзионной головки (фильеры), температуры, влажности сырья и вида обрабатываемой ВРБ. Обычно для предобработки ВРБ используются двойные шнеки, скорость вращения шнеков 25–75 об/мин, температура от 20 до 160°C, влажность сырья 25–50%, экструзионная обработка может сочетаться с воздействием на ВРБ щелочей или кислот [54–56].

Экструзия является эффективным методом предобработки, увеличивающим РС в несколько раз; к преимуществам метода можно также отнести осуществление его в непрерывном режиме. Следует, однако, учитывать, что «ужесточение» условий процесса экструзии, вызывающее увеличение РС, может приводить к образованию побочных продуктов, которые могут быть токсичными как для ферментов, используемых для получения С6 и С5 сахаров, так и микроорганизмов на стадии переработки сахаров в этанол [49].

ФИЗИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Для предобработки ВРБ используются радиационные методы – с помощью γ -лучей [57], потока электронов [58], микроволнового излучения [59], а также ультразвук [60]. Обработка γ -лучами (в дозах 100–800 кГр) и электронное излучение (в дозах до 800 кГр) приводит к снижению СП целлюлозы и разупорядочению её структуры, однако интенсивное излучение (2000 кГр и выше) вызывает высокую степень повреждения целлюлозы [61–65]. Радиационные методы предобработки не приводят к удалению лигнина.

Микроволновое излучение с частотой от 300 МГц до 300 ГГц (и длиной волны от 1 м до 1 мм) применяется для предобработки ВРБ благодаря своей простоте, низкому энергопотреблению и минимальному образованию токсичных побочных продуктов [66].

Ультразвуковые волны могут изменять морфологию лигноцеллюлозных материалов. Во время ультразвуковой обработки происходит образование кавитационных пузырьков, которые «взрывают» целлюлозу и гемицеллюлозы, тем самым повышая их доступность для воздействия ферментов. Для предобработки ВРБ наиболее эффективен ультразвук с частотой 10–100 кГц. Мощность и продолжительность

ультразвукового воздействия на ВРБ подбирают исходя из вида биомассы и концентрации суспензии обрабатываемого сырья [67, 68].

В целом физические методы предобработки характеризуются относительно низким энергопотреблением, не требуют применения повышенной температуры и не сопровождаются образованием побочных токсичных продуктов, однако РС увеличивается относительно незначительно. Эффективность физических методов предобработки увеличивается при их использовании в сочетании с последующей обработкой ВРБ кислотами или щелочами [69, 70]. Отметим, что масштабирование методов физической предобработки затруднено [15, 49].

ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Предобработка с помощью водных растворов кислот

Этот вид предобработки является широко распространённым [71, 72], он приводит к разрушению лигноцеллюлозного матрикса вследствие расщепления гликозидных связей, солюбилизации гемицеллюлоз и частично лигнина [71–74]. Предобработку можно осуществлять как с помощью концентрированных, так и разбавленных растворов кислот. Использование концентрированных кислот менее предпочтительно, поскольку требует соблюдения более строгих мер безопасности, применения оборудования с повышенной коррозионной стойкостью, регенерации кислот, а также приводит к более интенсивному образованию фурановых соединений – фурфурола из С5 сахаров и гидроксиметилфурфурола из С6 сахаров, способных к ингибированию микроорганизмов [75].

Для предобработки ВРБ используют различные минеральные кислоты (H_2SO_4 , HNO_3 , HCl , H_3PO_4), для промышленной предобработки наибольшее распространение получила серная кислота [76].

Предобработка кислотами осуществляется при высокой температуре ($\sim 180^\circ C$) в течение небольшого промежутка времени (до 15 мин) или при более низких температурах ($\sim 120^\circ C$) в течение более длительного времени (30–90 мин). Увеличение температуры приводит к интенсификации процесса образования фурановых соединений; выход побочных продуктов зависит также от концентрации кислоты (например серная кислота в концентрации 0,05% приводит к более высокой степени разложения сахаров в фурановые соединения по сравнению с 0,01% кислотой) и от вида кислоты – предобработка серной кислотой приводит в среднем в 1,3 раза меньшему образованию фурфурола по сравнению с азотной [74]. Соляная кислота требует более низкой температуры, чем серная, что приводит к снижению скорости обра-

зования продуктов деструкции сахаров [77]. Для предобработки ВРБ используют также уксусную, лимонную и щавелевую кислоты [78].

В целом предобработка с помощью кислот приводит к существенному увеличению РС, недостатками являются относительно высокая стоимость процесса, коррозия оборудования, образование токсичных побочных продуктов, а также необходимость регенерации кислот.

Предобработка с помощью сольвентов

Предобработка ВРБ органоэтанолом направлена на сольватацию лигнина и гемицеллюлозы и проводится с помощью различных органических или водно-органических растворителей с добавлением катализаторов (или без них) при температуре 100–250°C [79,80]. В качестве растворителей используются спирты с низкой температурой кипения (метанол и этанол), более высококипящие спирты (этиленгликоль, глицерин), другие органические соединения (диметилсульфоксид, простые эфиры и кетоны). Широкое распространение получил этанол – из-за высокой эффективности предобработки ВРБ, а также простоты регенерации путем дистилляции [79]. Использование глицерина (температура кипения 290°C) и этиленгликоля (197,6°C) позволяет избежать использования высокого давления, применяемого для высоколетучих и легко воспламеняющихся растворителей [81]. В качестве катализатора применяют различные кислоты, наиболее часто – серную, соляную или уксусную [82].

Предобработка с помощью органоэтанолом приводит к весьма существенному увеличению РС целлюлозы. Преимуществом этого вида предобработки является также возможность выделения интактного лигнина и использования его для получения пластиков и композитных материалов [82]. К недостаткам относятся относительно высокая стоимость процесса и необходимость регенерации органических растворителей.

Делигнификация с помощью глубоких эвтектических растворителей (deep eutectic solvents) – класса растворителей, состоящих из двух компонентов, способных формировать эвтектическую смесь с точкой плавления значительно ниже, чем у каждого отдельного компонента. Один из компонентов выступает в роли акцептора водородных связей (четвертичные аммониевые соли – например, холин-хлорид), второй компонент – в роли донора водородных связей (органические кислоты – малоновая, лимонная, янтарная и т.д., многоосновные спирты – глицерин, этиленгликоль, мочевины и другие соединения) [83–85].

Для предобработки ВРБ обычно используют глубокие эвтектические растворители в виде холин-хлорида:мочевины, например в

соотношении (1 : 2) [86], смеси гуанидина гидрохлорида и *n*-толуол-сульфоновой кислотой [87]. Процесс предобработки осуществляется при температурах ниже 100°C или близких к комнатной, в течение минут или десятков минут.

Предобработка с помощью эвтектических растворителей приводит к эффективной солюбилизации лигнина и гемицеллюлозы и увеличивает РС целлюлозы; используемые для предобработки вещества не токсичны и биоразлагаемы. Недостатком метода является относительно высокая стоимость процесса, высокая вязкость растворителей, а также необходимость рекуперации химических веществ, используемых в качестве компонентов растворителей.

Предобработка с помощью щелочей

Этот вид предобработки приводит к удалению (солюбилизации) лигнина за счёт расщепления химических связей между гемицеллюлозами и лигнином, к некоторому уменьшению СП целлюлозы и набуханию её волокон с увеличением объёма пор и площади внутренней поверхности, что увеличивает её РС при ферментативном гидролизе [88].

Для щелочной предобработки ВРБ используют NaOH, KOH, NH₄OH, Ca(OH)₂ [89–91], процесс можно проводить при низкой (20–50°C) температуре и нормальном давлении, однако для этого требуется относительно длительное время (например, несколько часов или дней); увеличение температуры существенно сокращает время процесса [92]. Концентрация щёлочи обычно составляет 0,5–2%. Для предобработки используют также смесь Na₂CO₃ и H₂O₂ [93] или Na₃PO₄ и Na₂S [94].

Щелочные агенты могут омылять эфирные связи между 4-О-метил-*D*-глюкуронидом и ксиланом, что приводит к образованию заряженных карбоксильных групп на поверхности предобработанного сырья.

Щелочная предобработка заметно увеличивает доступностью целлюлозы и гемицеллюлозы для ферментативного гидролиза, однако вызывает нарекания с точки зрения экологии поскольку приводит к необходимости утилизации и обеззараживания сточных вод с растворённым лигнином; применяемые химикаты безвозвратно теряются в виде солей.

Предобработка с помощью ионных жидкостей

Ионные жидкости (ИЖ) – это вид органических солей, существующих в жидком состоянии в широком интервале температур, в том числе при

комнатной температуре из-за их низкой температуры плавления (при нормальном давлении) [15]. ИЖ обычно состоят из органического катиона и неорганического (или органического) аниона. Летучесть компонентов ИЖ ограничена из-за низкого давления паров, они не горючи, поэтому позиционируются как зелёные растворители [45]. За счёт взаимодействия с гидроксильными группами целлюлозы ИЖ разрушают её внутри- и межмолекулярные водородные связи, что приводит к растворению целлюлозы, гемицеллюлозы тоже в значительной степени сольбилизируются [46]. ИЖ, состоящие из катионов производных пиридиния или имидазолия (в виде хлоридов) эффективно растворяют целлюлозу, этот процесс значительно ускоряется при микроволновом нагреве смеси в условиях которого удаётся получить растворы целлюлозы с концентрацией до 25% [95–98]. К растворению целлюлозы приводят такие ИЖ как 3-метил-N-бутилпиридиний хлорид ([ВМРУ]Cl) и 1-N-бутил-3-метилимидазолий хлорид ([ВММ]Cl), а также 1-алкил-3-метилимидазолий хлорид ([АММ]Cl), 1-этил-3-метилимидазолий ацетат ([ЕММ]Ac), 1,3-диметилимидазолий диметилфосфат ([МММ]DMP) и др. [99–101].

Целлюлоза легко осаждается из растворов в ионных жидкостях добавлением противорастворителя – воды, спирта или ацетона, РС такой целлюлозы существенно увеличивается. Ионные жидкости могут быть после этого регенерированы различными способами: отгонкой воды, ионным обменом, первопорацией, обратным осмосом или высаливанием.

Существуют ИЖ, которые растворяют лигнин – например бис-2-гидроксиэтиламмоний пропионат [102] или 1-этилпиридиний бромид ([Еру]Br) [103].

К преимуществам использования ИЖ для предобработки ВРБ относятся их высокая эффективность с точки зрения увеличения РС, возможность осуществления процесса с использованием умеренных температур, отсутствие образования побочных продуктов. К недостаткам относятся необходимость отделения ИЖ от предобработанного сырья и регенерации ИЖ для уменьшения затрат на процесс предобработки, высокая вязкость ИЖ, возможное токсичное воздействие ИЖ на ферменты.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Паровой взрыв (автогидролиз)

Этот вид предобработки является одним из наиболее часто используемых на практике методов [49]. ВРБ подвергают воздействию насыщенного водяного пара высокого давления при температурах

160–260°C и давлении 0,7–4,8 МПа в течение короткого промежутка времени с последующим сбросом давления. Волокна растительной клеточной стенки набухают, что приводит к повышению доступности целлюлозы для ферментов [67]. Под действием уксусной кислоты, полученной при расщеплении ацетильных групп гемицеллюлоз, происходит их частичный гидролиз с образованием С5 сахаров [104]. Основными факторами, влияющими на результаты предобработки паровым взрывом, являются время пребывания ВРБ в рабочей зоне, температура, размер частиц сырья. Более низкая температура предобработки и более длительное время пребывания сырья в рабочей зоне являются более благоприятными с точки зрения образования ингибиторов ферментов и микроорганизмов. С этой точки зрения, например, температура 190°C и время 10 мин выглядят более привлекательными, чем 270°C и время 1 мин [67, 105]. Эффективность паровой обработки можно повысить введением разбавленных растворов серной кислоты (0,5% [106]), перекиси водорода (0,2–1% [107]), SO₂ или CO₂ в качестве катализаторов [108]. Введение кислотных катализаторов вызывает гидролиз гемицеллюлоз и образование С5 сахаров.

Предобработка паровым взрывом заметно увеличивает РС, при этом характеризуется низким энергопотреблением, малым расходом химических реагентов, отсутствием необходимости их регенерации. Этот вид предобработки является эффективным по отношению к лиственной древесине и различным сельскохозяйственным отходам, однако мало эффективен к древесине хвойных пород. Недостатком метода является также неполное удаление лигнина, образование ароматических соединений – ингибиторов гидролитических ферментов и микроорганизмов, частичное разложение ксилана и гемицеллюлоз с возможным образованием фурановых соединений [108–110].

Гидротермическая предобработка (liquid hot water)

Этот вид предобработки сходен с предыдущим, но в данном случае используется жидкая вода при повышенных температурах, а не пар. Под действием горячей воды происходит плавление лигнина и последующее образование его микрочастиц при понижении температуры (псевдолигнин), а также частичный гидролиз гемицеллюлоз. Этот способ предобработки сохраняет целлюлозу в волокнистом состоянии, при этом её доступность для ферментов увеличивается; образования фурановых соединений – продуктов деструкции сахаров не происходит [104, 111, 112]. Предобработка горячей водой является одним из наиболее перспективных методов, поскольку не требует

использования химических веществ (и является зелёной технологией). Гидротермическая предобработка проводится при температуре до 230°C под давлением до 5 МПа, кратковременно (в течение минут или десятков минут) с последующим сбросом давления. Для удаления псевдолигнина проводят дополнительную обработку сырья, например с помощью водно-щелочных растворов [111].

Существуют методы двухступенчатой предобработки горячей водой, когда на первой стадии ВРБ обрабатывают в более мягких условиях (180°C в течение 60 мин) для деструкции гемицеллюлоз (с получением C5 сахаров), а на второй стадии ужесточают условия (200°C, 20 мин) для плавления лигнина [94].

Преимуществами метода являются заметное увеличение РС, отсутствие образования токсичных побочных продуктов, отсутствие необходимости использования химических реагентов и соответствие требованиям экологии. Недостатками служат незначительная степень удаления лигнина, необходимость оптимизации процесса для минимизация эффекта образования псевдолигнина.

*Аммиачный взрыв (ammonia fiber explosion, AFEX)
и перколяционная рециклизация аммиака
(ammonia recycle percolation, ARP)*

В этом способе предобработки ВРБ под высоким давлением при температуре 60–100°C (или при температуре окружающей среды) пропитывают жидким аммиаком, что приводит к набуханию растительных волокон. При сбросе давления происходит вскипание аммиака, которое вызывает разрушение волокон и частичную декристаллизацию целлюлозы. Кроме того, аммиак вызывает расщепление связей между лигнином и углеводами [113, 114]. Происходит дезтерификация ацетильных фрагментов гемицеллюлоз, причем высвобождающаяся уксусная кислота лишена своих каталитических свойств [115]. Примечательно, что предобработка с помощью AFEX не приводит к образованию таких ингибиторов как фурфурол или 5-гидроксиметилфурфурол [15].

Вариантом AFEX является процесс с перколяционной рециклизацией аммиака (ARP), в котором водный раствор аммиака (5–15%) проходит через реактор, заполненный ВРБ. Температура процесса поддерживается в интервале 140–210°C (время – до 90 мин). В этих условиях происходит солубилизация гемицеллюлоз, целлюлоза остаётся интактной и её кристалличность не меняется [116].

Методы AFEX и ARP увеличивают РС, не приводят к образованию ингибиторов процессов ферментации. Ограничениями этих методов

служат необходимость регенерации и оборота аммиака в производственном цикле, а также то, что наилучшие результаты они дают на недревесном сырье.

Углекислотный взрыв

Углекислотный взрыв – это предварительная обработка ВРБ с помощью сверхкритического CO_2 [117, 118]. Углекислый газ в сверхкритическом состоянии является сжиженной субстанцией, которая способна экстрагировать и удалять лигнин. При наличии воды углекислый газ образует угольную кислоту, которая гидролизует гемицеллюлозы. Молекулы CO_2 под давлением могут проникать сквозь мелкие поры лигноцеллюлозы; взрывная декомпрессия нарушает структуру растительных волокон и увеличивает поверхность для возможной атаки ферментами [119]. Процесс предобработки ВРБ углекислотным взрывом не сопровождается образованием ингибиторов.

По сравнению с другими «взрывными» методами углекислотный взрыв менее эффективен с точки зрения увеличения РС. Преимуществом его, помимо отсутствия образования ингибиторов, является то, что выделение углекислого газа является неизбежным спутником любого бродильного производства, что решает проблему обеспечения этим реагентом при производстве биоэтанола [103].

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Биологическая предобработка осуществляется с помощью воздействием на ВРБ микроорганизмов, продуцирующих ферменты, способные разлагать лигнин, полифенолы и гемицеллюлозу. Для этого преимущественно используют грибы белой гнили (*Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata*, *Trametes versicolor* и др.) – основные деструкторы лигнина в природе [120–122]. В последнее время для делигнификации используются некоторые бактерии [94]. Скорость процесса биологической предобработки мала, поскольку, как правило, для этого используют процесс твёрдо-фазной ферментации (10–14 суток), при этом необходимо тщательное соблюдение условий роста грибов, используемых для предобработки, следует также использовать значительные площади, требуемые для размещения ферментационного оборудования – всё это существенно ограничивает возможности промышленного применения биологической предобработки. Этот вид предобработки можно применять как индивидуально, так и в сочетании с другими методами [123].

Таким образом, существуют разнообразные методы предобработки ВРБ, которые в той или иной степени приводят к увеличению

доступности полисахаридов ВРБ для ферментов (в первую очередь – целлюлозы). Достоинства и ограничения, свойственные различным методам предобработки систематизированы в табл. 2.

Как отмечалось выше, предобработка может приводить к образованию побочных токсичных продуктов. Таковыми могут быть фурановые соединения – из С5 сахаров образуется фурфурол, из С6 сахаров – 5-гидроксиметилфурфурол [75]. Кроме того, из гемицеллюлоз образуется карбоновые кислоты (уксусная и муравьиная), ароматические соединения (ванилин, кумаровая, феруловая и салициловая кислоты, 4-гидроксibenзальдегид и др.). Перед началом процесса гидролиза/ферментации требуется детоксификация ингибиторов. Удаление фурановых соединений осуществляется с помощью активированного угля; нейтрализацию карбоновых кислот проводят гидроксидом натрия, кальция или аммиаком; комплексную экстракцию фурановых соединений и карбоновых кислот осуществляют смесью 20% триалкиламина, 70% октанола и 10% керосина [76]. Негативное влияние производных лигнина элиминируется под действием пероксидазы [49].

Для оценки эффективности предобработки существует несколько критериев. Процесс должен характеризоваться низкими капитальными и эксплуатационными затратами; быть эффективным в широком диапазоне физических параметров; приводить к выделению большинства компонентов сырья в виде отдельных фракций; подготовка сырья (например, уменьшение размера частиц) должна быть минимизирована. Предобработка по возможности не должна приводить к получению продуктов распада сахаров и лигнина, которые ингибируют действие гидролитических ферментов и рост микроорганизмов. Процесс не должен потреблять много энергии, стоимость используемых катализаторов должна быть минимальна, должна осуществляться их регенерация. Предобработка по возможности должна позволить реализовать производство продуктов с добавленной стоимостью, например, С5 сахаров, для снижения потребности использования гемицеллюлаз в процессе ферментативного гидролиза предобработанного сырья [2].

Практическое применение при масштабировании методов получения биотоплива 2 поколения получили такие методы как паровой взрыв (автогидролиз), обработка горячей водой, разбавленными кислотами, аммиаком.

Одним из наиболее перспективных на наш взгляд методов предобработки ВРБ является промышленная технология щелочной крафт-варки древесины (сульфатная варка с использованием $\text{NaOH} + \text{Na}_2\text{S}$ –

Таблица 2. Возможности различных методов предобработки.

Метод предобработки	Достоинства	Ограничения
1	2	3
Измельчение	Существенное увеличение РС, снижение кристалличности целлюлозы, увеличение поверхности доступной ферментам, экологическая безопасность	Высокое энергопотребление, относительно низкая производительность, необходимость интенсивного теплоотвода
Экструзия	Возможность осуществления в непрерывном режиме	Возможное образование побочных продуктов
Физические методы	Небольшая энергоёмкость, использование низкой температуры, отсутствие потребности в химикатах, отсутствие образования токсичных продуктов	Невысокая эффективность, трудность масштабирования
Кислоты	Существенное увеличение РС, гидролиз гемицеллюлоз до С5 сахаров, частичное разрушение лигнина	Относительно высокая стоимость, коррозия оборудования; образование токсичных вторичных продуктов, необходимость регенерации кислот
Органозоль	Существенное увеличение РС, извлечение интактного лигнина	Высокая стоимость, необходимость регенерации органических растворителей, необходимость использования химикатов
Глубокие эвтектические растворители	Существенное увеличение РС, соллобилизация лигнина	Высокая стоимость, высокая вязкость растворителей, необходимость рекуперации растворителей
Щелочи	Существенное увеличение РС, удаление лигнина; использование умеренных температур, увеличение поверхности, доступной ферментам	Длительность осуществления процесса, необходимость обеззараживания отходов в виде водных растворов лигнина, безвозвратное использование щелочей

Окончание табл. 2 см. на сл. стр.

Окончание табл. 2

1	2	3
Крафт-варка	Существенное увеличение РС, эффективная делигнификация, применяется на целлюлозно-бумажных предприятиях, предусматривается сжигание лигнина, отработана система утилизации отходов, регенерация химикатов	Не используются С5 сахара
Ионные жидкости	Существенное увеличение РС, эффективная делигнификация, использование умеренных температур, отсутствие образования токсичных вторичных продуктов	Высокая стоимость, необходимость отделения ИЖ от сырья, необходимость регенерации ИЖ высокая вязкость ИЖ, возможность токсичного действия ИЖ на ферменты
Паровой взрыв	Существенное увеличение РС, относительное низкое энергопотребление, отсутствие потребности в химикатах и их регенерации	Неполное удаление лигнина и неполное разрушение лигно-углеводной матрицы, образование токсичных вторичных продуктов, эффективность не ко всем видам сырья
Гидротермическая обработка	Увеличение РС, отсутствие образования токсичных вторичных продуктов, отсутствие потребности в химикатах и их регенерации, максимальное соответствие требованиям экологии	Неполное удаление лигнина, необходимость оптимизации процесса для предотвращения образования псевдолигнина
AFEX, ARP	Увеличение в определённой степени РС, отсутствие образования токсичных вторичных продуктов	Необходимость регенерации и обороте аммиака в производственном цикле, достижение наилучших результатов на недревесном сырье
Углекилотный взрыв	Отсутствие образования токсичных продуктов	Относительно невысокая эффективность
Биологические методы	Деструкция лигнина и гемицеллюлоз; низкое энергопотребление, отсутствие образования токсичных продуктов	Относительно низкая эффективность, длительное время предварительной обработки

белого щёлока), применяемая на целлюлозно-бумажном производстве. Она обеспечивает эффективную делигнификацию ВРБ (древесины как хвойных, так и лиственных пород, а также однолетних растений), удаление лигнина и гемицеллюлоз и соответствующее существенное увеличение РС целлюлозы, кроме того технология предусматривает регенерацию неорганических химических веществ, используемых для варки; сжигание остаточного лигнина для получения энергии, применение хорошо налаженной системы очистки сточных вод. Этот метод предобработки позволяет использовать оборудование и системы химической рекуперации, которые уже хорошо развиты в целлюлозной промышленности [20, 125, 126]. К недостаткам метода можно отнести неэффективное использование гемицеллюлоз и С5 сахаров.

IV. РЕАКЦИОННАЯ СПОСОБНОСТЬ ПЕРВИЧНЫХ И ПРЕДОБРАБОТАННЫХ ВИДОВ ВРБ

В ряде работ [20, 126–130] мы проанализировали РС разных видов ВРБ (как необработанных, так и прошедших предобработку). РС определяли при гидролизе смесью ферментных препаратов целлюлаз *Penicillium verruculosum* В151 и целлюбиазы (β -глюкозидазы) *P. verruculosum* F10. За критерий РС принимали степень конверсии ВРБ до восстанавливающих сахаров (ВС) от с.в. сырья при исчерпывающем ферментативном гидролизе. Результаты систематизированы в табл. 3.

ОТХОДЫ СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА

Солома, не подвергшаяся предобработке, характеризуется низкой РС – глубина её исчерпывающего ферментативного гидролиза составляет 12%. Измельчение соломы на планетарной шаровой мельнице тонкого помола (до среднего размера частиц 10-20 мкм) приводит к увеличению РС до 45%. Предобработка пшеничной соломы щелочью (85°C, 1% NaOH), а также с помощью парового взрыва приводит к более заметному увеличению РС соломы – до 55 и 69–75% соответственно.

Свекловичный жом характеризуется сравнительно невысокой РС (20%), которая несколько увеличивается при его измельчении на молотковой дробилке и после экструзионной обработки (27% в обоих случаях). Оптимизация состава ферментного комплекса и использование совместно с целлюлазами гемицеллюлаз и пектиназ позволяет существенно увеличить его РС (без какой-либо предобработки) до 68% [129].

Таблица 3. Реакционная способность (РС) различных видов ВРБ при гидролизе смесью ферментных препаратов *P. verruculosum* В151 и F10 (50°C, pH5,0, 48 час) (по данным [20, 126–130])*

ВРБ	РС, степень конверсии сырья **
1	2
Отходы сельского хозяйства	
Пшеничная солома	12
Пшеничная солома, измельченная на лабораторной планетарной шаровой мельнице АГО-2С (<20 мкм)	45
Пшеничная солома, предобработанная 1% NaOH, 85°C	55
Пшеничная солома, предобработанная паровым взрывом	75
Пшеничная солома, предобработанная паровым взрывом в присутствии Ca(OH) ₂	69
Свекловичный жом	20
Свекловичный жом, измельченный на молотковой дробилке	27
Свекловичный жом экструдированный	27
Свекловичный жом, гидролизованный мультиэнзимной композицией (целлюлазы, гемицеллюлазы, пектиназы)	68
Овсяная шелуха	5
Овсяная шелуха, предобработанные паровым взрывом в присутствии Ca(OH) ₂	76
Соевые оболочки	31-38
Соевая оболочки, предобработанные паровым взрывом в присутствии Ca(OH) ₂	58
Соевые оболочки, предобработанные H ₂ SO ₄ (1%, 121°C, 1 ч)	82
Соевые оболочки, предобработанные NaOH (2%, 121°C, 1 ч)	88
Оболочки люпина	20
Оболочки люпина, предобработанные H ₂ SO ₄ (0,25-1%)	43-67
Лузга подсолнечника	3
Лузга подсолнечника, измельченная на лабораторной планетарной шаровой мельнице АГО-2С (<20 мкм)	7
Кукурузные стебли	10
Кукурузные стебли, предобработанные паровым взрывом в присутствии H ₂ SO ₄	40-55
Кукурузные стебли, предобработанные паровым взрывом в присутствии Ca(OH) ₂	36
Кукурузные початки	24
Стебли сахарного тростника (багасса)	17-18
Багасса, измельченная на лабораторной планетарной шаровой мельнице АГО-2С (<20 мкм)	42
Багасса, предобработанная паровым взрывом в присутствии Ca(OH) ₂	41
Багасса, предобработанная паровым взрывом в присутствии H ₂ SO ₄	34
Багасса, предобработанная H ₂ SO ₄ (1%, 121°C, 1 ч)	36
Багасса, предобработанная NaOH (2%, 121°C, 1 ч)	82
Пустые плодовые гроздь масличной пальмы	13
Пустые плодовые гроздь масличной пальмы, предобработанные H ₂ SO ₄ (1%, 121°C, 1 ч)	34

Окончание табл. 3 см. на сл. стр.

Окончание табл. 3

1	2
Пустые плодовые гроздья масличной пальмы, предобработанные NaOH (2%, 121°C, 1 ч)	37
Отходы пищевой промышленности	
Дробина пивная (пшеница-рожь)	10
Барда спиртовая (сухая)	18
Барда спиртовая (влажная)	16
Пшеничные отруби	14
Пшеничные отруби, измельченные на лабораторной планетарной шаровой мельнице АГО-2С (<20 мкм)	До 62
Отходы лесной и деревообрабатывающей промышленности	
Сосновые опилки	8
Сосновые опилки (обессмоленные), измельченные на лабораторной панетарной шаровой мельнице АГО-2С (<20 мкм)	45
Опилки лиственницы	6
Опилки лиственницы, измельченные на лабораторной планетарной шаровой мельнице АГО-2С (<20 мкм)	22
Осиновые опилки	8
Осиновые опилки, измельченные на лабораторной планетарной шаровой мельнице АГО-2С (<20 мкм)	50
Осиновые опилки, предобработанные H ₂ SO ₄ (1%, 140°C, 1 ч)	36
Осиновые опилки, предобработанные H ₂ SO ₄ (8%, 140С, 1 ч)	55
Осиновые опилки, предобработанные HNO ₃ (1%, 130С, 1 ч)	57
Осиновые опилки, предобработанные HNO ₃ (4,8%, 125С, 1 ч)	72
Осиновые опилки, предобработанные органоэольвом (65% бутанола, 45% Н ₂ О, 0,54% Н ₂ SO ₄ , 140°C 1ч)	54
Осиновые опилки, предобработанные органоэольвом (65% этанола, 45% Н ₂ О, 0,54% Н ₂ SO ₄ , 140°C, 1ч)	45
Продукты и отходы целлюлозно-бумажной промышленности	
Хвойная сульфатная целлюлоза, белёная, влажная	78
Хвойная сульфатная целлюлоза, небелёная, влажная	68
Хвойная сульфатная целлюлоза, белёная, сухая	58
Хвойная сульфатная целлюлоза, небелёная, сухая	48
Лиственная сульфатная целлюлоза, белёная, влажная	66
Лиственная сульфатная целлюлоза, небелёная, влажная	56
Лиственная сульфатная целлюлоза, белёная, сухая	50
Лиственная сульфатная целлюлоза, небелёная, сухая	42
Отходы производства целлюлозы (отходы сортировки производства небелёной сульфатной целлюлозы)	80
Отходы производства целлюлозы (скоп, волоконсодержащие отходы бумажной фабрики, выпускающей гофротару)	13
Отходы резки пергамента	85

* Дозировка целлюлозного ферментного препарата В151 – 10 мг белка на 1 г с.в. сырья, дозировка β-глюкозидазного препарата F10 – 3 мг/г. За критерий РС принимают степень конверсии ВРБ до ВС от с.в. сырья при исчерпывающем ферментативном гидролизе.

** По выходу ВС, в % от с.в. сырья

Овсяная шелуха обладает низкой РС (5%), её предобработка с помощью парового взрыва в присутствии $\text{Ca}(\text{OH})_2$ приводит к значительному увеличению РС (до 76%).

Соевые оболочки характеризуются высокой РС (38%). Предобработка этого субстрата паровым взрывом в присутствии $\text{Ca}(\text{OH})_2$ приводит к увеличению РС (до 58%). Предобработка соевых оболочек с помощью серной кислоты, а также щёлочи приводит к весьма существенному увеличению РС (до 82 и 88% соответственно). РС оболочек люпина возрастает с 20 до 43–67% после предобработки разбавленной серной кислотой.

РС лузги семян подсолнечника очень низкая (3%) и практически не увеличивается после интенсивного измельчения на планетарной шаровой мельнице тонкого помола (7%).

Кукурузные стебли обладают низкой РС (10%), их предобработка с помощью парового взрыва в присутствии H_2SO_4 или $\text{Ca}(\text{OH})_2$ позволяет значительно увеличить реакционную способность (до 36–55%). Кукурузные початки характеризовались относительно невысокой РС (24%).

РС стеблей сахарного тростника, остающихся после извлечения сока (багассы), равна 17–18%, она увеличивается до 42% после измельчения на планетарной шаровой мельнице тонкого помола, до 34–41% после парового взрыва в присутствии $\text{Ca}(\text{OH})_2$ или H_2SO_4 , до 36% после предобработки разбавленной серной кислотой и до 82% после предобработки щёлочью.

РС плодовых гроздьев масличной пальмы низка и составляет 13% и увеличивается до 34–37% после предобработки разбавленными серной кислотой, а также щёлочью.

ОТХОДЫ ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Пивная дробина и спиртовая барда являются основными отходами пивоваренного и спиртового производств. Пивная дробина обладает низкой РС (10%), сухая и влажная спиртовая барда характеризуются несколько более высокой РС (18 и 16% соответственно). Пшеничные отруби также имели небольшую РС (14%), измельчение отрубей на планетарной шаровой мельнице тонкого помола существенно увеличивало их РС (до 62%).

ОТХОДЫ ЛЕСНОЙ И ДЕРЕВООБРАБАТЫВАЮЩЕЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

РС сосновых, осиновых и лиственничных опилок весьма низкая (6–8%). Измельчение сосновых или осиновых опилок на планетарной шаровой мельнице тонкого помола увеличивает их реакционную

способность до 45–50%, однако измельчённые опилки лиственницы имеют РС только 22%. Предобработка осиновых опилок серной кислотой различной концентрации увеличивает РС до 36–55%, азотной кислотой различной концентрации – до 57–72%; предобработка органо-зольём различного состава увеличивает РС до 45–54%.

ПРОДУКТЫ И ОТХОДЫ ЦЕЛЛЮЛОЗНО-БУМАЖНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Влажные хвойная белёная и небелёная виды крафт-целлюлозы, полученные в результате сульфатной варки, обладают очень высокой РС – 78 и 68% соответственно; их высушенные образцы проявляют несколько меньшую РС – 58 и 48%. Влажные лиственная белёная и небелёная виды крафт-целлюлозы после сульфатной варки имеют РС 66 и 56%, высушивание приводит к падению их РС до 50 и 42% соответственно. Причиной снижения РС при высушивании целлюлозы служит явление ороговения поверхности, приводящее к уменьшению её доступности ферментам [24, 28]. В целом РС хвойной целлюлозы превышает РС лиственной, а РС белёных видов целлюлозы выше РС небелёных.

Очень высокую РС (80%) демонстрируют отходы целлюлозно-бумажной промышленности – отходы сортировки производства небелёной сульфатной крафт-целлюлозы. Однако РС другого вида отходов – скопа (волоконсодержащих отходов бумажной фабрики, выпускающей гофротару) невелика (13%).

Также очень высокую РС (85%) продемонстрировали отходы резки пергамента (упаковочный жиростойкий материал). Пергамент представляет собой практически чистую целлюлозу; процесс пергаментизации состоит в обработке бумаги-основы концентрированной серной кислотой, что приводит к набуханию и полной аморфизации целлюлозы.

Таким образом большинство видов ВРБ, не прошедших предобработки – солома, кукурузные стебли, багасса, овсяная шелуха, лузга семян подсолнечника, плодовые гроздьё масличной пальмы, древесина сосны, лиственницы, осины – характеризуются низкой РС при ферментативном гидролизе (3–18%). Несколько выше РС таких первичных видов ВРБ как оболочки люпина и кукурузные початки – 20–24%. Повышенной РС обладают соевые оболочки – 31–38%, а свекловичный жом при правильном выборе ферментного комплекса для гидролиза демонстрирует РС 68% без какой-либо предобработки.

Механическая (измельчение), химическая (обработка кислотами, органоазольном, щелочью) или физико-химическая (паровой взрыв) предобработка существенно увеличивает РС разных видов ВРБ и позволяет, например, достичь для соломы РС до 75%, овсяной шелухи – 76%, соевых оболочек – 88%, стеблей кукурузы – 55%, багассы – 82%, различных видов древесины – 45–72%.

Несушённые хвойная и лиственная крафт-целлюлоза, полученная в результате сульфатной варки, подвергнутые ферментативному гидролизу, характеризуется высокой РС – 78 и 66% для белёных видов целлюлозы, и 68 и 66% для небелёных видов. Некоторые из видов отходов целлюлозно-бумажной промышленности демонстрируют очень высокую РС – 80–85%.

V. ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ГИДРОЛИЗ ВРБ И ВОЗМОЖНОСТИ УВЕЛИЧЕНИЯ ЕГО ЭФФЕКТИВНОСТИ

Целлюлоза и гемицеллюлозы представляют собой сложные по структуре и молекулярному составу субстраты, для их эффективной конверсии в моносахариды требуется комплекс карбогидраз, функционирующий в синергитическом режиме [16, 131–135].

Ферментативный гидролиз целлюлозы осуществляется целлюлазным комплексом, представляющим собой группу различающихся по субстратной специфичности ферментов. Целлюлолитические ферменты относятся к классу β -1,4-глюканаз (гликозидгидролаз), расщепляющих β -1,4-связи в О-гликозильных соединениях. По типу действия на субстраты целлюлазы делятся на эндо- β -1,4-глюканазы (КФ 3.2.1.4), экзо-целлобиогидролазы (КФ 3.2.1.91 и 3.2.1.176) и β -глюкозидазы (КФ 3.2.1.21) [16, 136–138].

Большинство целлюлаз и гемицеллюлаз микроскопических грибов проявляют максимальную активность при pH 4,0–5,0; некоторые ферменты характеризуются pH-оптимумом активности, сдвинутым в более кислые значения (pH 2,5–3,0) или в более щелочные значения (pH 5,5–9,0). Температурный оптимум действия большинства грибных целлюлаз и гемицеллюлаз составляет 45–65°C.

ЦЕЛЛЮЛАЗЫ

Эндо- β -1,4-глюканазы (ЭГ) – гидролизуют внутренние β -1,4-гликозидные связи, удаленные от концов полимерной цепи целлюлозы (а также лихенана, β -глюкана, карбоксиметилцеллюлозы) с образованием фрагментов полимерного субстрата и целлоолигосахаридов, что сопровождается существенным уменьшением СП субстрата. ЭГ, как правило, расщепляют аморфные участки целлюлозы; известны

также ЭГ, гидролизующие кристаллическую целлюлозу. По степени процессивности действия на полисахаридный субстрат ЭГ подразделяются на ферменты менее упорядоченного и более упорядоченного типа действия [139]. Первые вызывают более резкое уменьшение СП субстрата с образованием крупных олигосахаридов (без образования моно- или дисахаридов), вторые одновременно с деполимеризацией субстрата отщепляют моно-, ди- и трисахариды и не столь существенно уменьшают СП целлюлозы. Активные центры ЭГ имеют вид «ущелья», в котором происходит связывание и гидролиз полимерной цепи целлюлозы или других полисахаридных субстратов.

Целлобиогидролазы (ЦБГ) отщепляют остатки целлобиозы от концов полимерных молекул нативной или частично гидролизованной целлюлозы. ЦБГ первого типа (ЦБГ1, КФ 3.2.1.176) атакуют молекулу целлюлозы с восстанавливающего конца, тогда как ЦБГ второго типа (ЦБГ2, КФ 3.2.1.91) действуют с невосстанавливающего конца. ЦБГ могут гидролизовать как аморфную, так и кристаллическую целлюлозу и являются основными ферментами, ответственными за деструкцию целлюлозы.

У ЦБГ «ущелье» активного центра полностью или частично закрыто пептидными петлями, в результате чего активный центр приобретает вид «туннеля». Именно из-за такого строения активного центра ЦБГ действуют на полимерный субстрат только с концов его молекул – в данном случае реализуется процессивный механизм гидролиза (механизм множественной атаки), когда после разрыва гликозидной связи не происходит десорбции полимерной цепи субстрата, а вместо этого она протягивается дальше вдоль «туннеля», и таким образом происходит серия гидролитических атак на одну и ту же молекулу целлюлозы с последовательным отщеплением остатков целлобиозы.

β -Глюкозидазы (БГ) осуществляют гидролиз целлобиозы и целлоолигосахаридов до глюкозы, атакуя субстрат с невосстанавливающего конца. Скорость гидролиза целлоолигосахаридов уменьшается с увеличением числа гликозидных остатков в олигосахариде. БГ обладают широкой специфичностью и способны расщеплять не только β -1,4-, но и β -1,2-, β -1,3-, β -1,6-гликозидные связи. Кроме того, многие БГ могут отщеплять терминальные гликозидные остатки от арил- и алкил-гликозидов. Свойство БГ гидролизовать целлобиозу является важным для получения глюкозы как конечного продукта ферментативной деструкции целлюлозы, и, кроме того, – для общего увеличения эффективности процесса ферментативной конверсии целлюлозы, поскольку целлобиоза и целлоолигосахариды являются

ингибиторами ЦБГ (в особенности) и ЭГ. Глюкоза ингибирует эти ферменты в значительно меньшей степени [16].

Полисахаридмонооксигеназы (ПМО). В 2010–2011 гг. были открыты ферменты, представляющие собой монооксигеназы, осуществляющие окислительную деструкцию природных полисахаридов (целлюлозы, гемицеллюлоз, хитина, крахмала, пектина). Эти ферменты классифицировали как семейство AA9 вспомогательных активностей (Family 9 of Auxiliary Activities; <http://www.cazy.org/AA9.html>). Один из таких ферментов (КФ 1.14.99.53-56) способен осуществлять деструкцию целлюлозы [16, 135]. Характерным свойством ПМО является их зависимость от катиона Cu^{2+} , который прочно связан в активном центре фермента за счет координации с двумя остатками гистидина. Реакции, катализируемые ПМО, требуют также наличия молекулы кислорода и донора электронов в реакционной смеси. В качестве последнего часто используют галловую или аскорбиновую кислоты, а также другие химические соединения, которые являются восстановителями. В природных условиях донором электрона может являться фермент целлобиозодегидрогеназа, которая катализирует сопряженную реакцию окисления целлобиозы; донором электронов могут быть также фенольные соединения – продукты биодеградациии лигнина.

Для целлюлаз (включая ПМО) и других карбогидраз микроскопических грибов характерна мультидоменная (бимодулярная) структура. В большинстве случаев они состоят из каталитического домена (КД), связанного подвижным сильно гликозилированным пептидным линкером с целлюлозосвязывающим доменом (ЦСД, в общем случае – углеводсвязывающим доменом). Разделить домены можно с помощью ограниченного протеолиза линкера.

Следует отметить, что некоторые из грибных целлюлаз, например ЭГ2а *P. verruculosum* или ЭГ3 *T. reesei* и *P. verruculosum* состоят только из КД [16].

КД представляют собой наиболее крупную часть молекул ферментов и осуществляют собственно катализ, т.е. расщепление гликозидных связей в целлюлозе и других полисахаридах. Молекулярные массы КД большинства целлюлаз находятся в диапазоне от 20 до 50 кДа [16]. Практически у всех известных к настоящему времени целлюлаз и других ферментов, гидролизующих полисахариды, каталитическими остатками являются карбоксильные группы аспарагиновой или глутаминовой кислот, одна из которых играет роль общего основания (нуклеофила), а другая – роль кислоты / основания.

ЦСД увеличивают активность целлюлаз и других карбогидраз при действии на нерастворимые субстраты, влияют на специфичность

ферментов, «концентрируют» ферменты на поверхности субстратов, ориентируют КД на определённые участки на нерастворимом субстрате, разрушают кристаллическую структуру субстрата [141, 142]. ЦСД грибных целлюлаз содержат от 35 до 40 а.о. и могут находиться как на N-конце, так и на C-конце белка. За связывание с целлюлозой отвечают три высоко консервативных ароматических остатка аминокислот, например тирозина (ЦБГ1), триптофана или фенилаланина.

Линкеры – это гибкие неупорядоченные пептиды с высоким содержанием пролина, серина, треонина, а также глицина и аланина. Длина линкеров может варьировать от 6 до примерно 100 а.о., но обычно колеблется в диапазоне от 20 до 50 а.о. Линкеры осуществляют пространственное разделение каталитических и адсорбционных доменов, что обеспечивает их автономное функционирование на поверхности субстрата. Разделение доменов в пространстве достигается благодаря жесткой части линкера, содержащей множественные остатки пролина (по аналогии с коллагеноподобным структурам), а автономность работы обоих доменов обеспечивается гибкой его частью линкера, богатой остатками глицина. Оксиаминокислоты, серин и треонин, обычно O-гликозилированы. Области линкера вблизи КД и ЦСД, богатые остатками пролина и глицина, часто не содержат оксиаминокислот – именно эти области подвергаются расщеплению протеазами в случае, когда осуществляется ограниченный протеолиз целлюлаз для разделения их основных функциональных доменов [37, 38].

Молекулы целлюлаз из аэробных бактерий могут содержать большее количество доменов, в частности – более одного ЦСД, и дополнительно – домены, отвечающие за связывание фермента на клеточной мембране либо за образование внеклеточного мульти-субъединичного комплекса ферментов. Еще более сложные структуры имеют целлюлазы анаэробных микроорганизмов. Для них характерно наличие в одной полипептидной цепи нескольких каталитических модулей со сходными или различными каталитическими функциями. Ферментные комплексы кластридий функционируют в виде высокомолекулярных агрегатов (целлюлосом), имеющих весьма сложное строение [16].

МЕХАНИЗМ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ ДЕСТРУКЦИИ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ

Аморфные участки фибрилл целлюлозы расщепляются ЭГ, в результате увеличивается количество свободных концов в молекуле целлюлозы – субстрата для действия ЦБГ, которые, в свою очередь, атакуют восстанавливающие (ЦБГ1) и невосстанавливающие (ЦБГ2)

концы полимерных молекул в кристаллической или аморфной зонах субстрата, отщепляя остатки целлобиозы. Целлобиоза и другие растворимые олигосахариды, образующиеся под действием ЭГ и ЦБГ, гидролизуются до глюкозы с помощью БГ. При действии ПМО целлюлозная цепь окисляется в произвольном месте на поверхности кристалла, что приводит к образованию свободных концевых групп – субстрата для действия ЦБГ. Появление заряженных группы на образующихся концах целлюлозы под действием ПМО способствуют аморфизации целлюлозы и повышают ее доступность для ферментов [135].

Для целлюлазного комплекса характерно явление синергизма. Синергетический эффект проявляется в том, что ЭГ увеличивает количество зон, с которыми может связаться ЦБГ; кроме того и ЦБГ, и ЭГ создают субстрат для БГ, а сама БГ минимизирует ингибирование ЦБГ целлобиозой и обеспечивает получение конечного продукта – глюкозы [135, 143]. Этот эффект может быть выражен коэффициентом (степенью) синергизма (КС), представляющий собой отношение между активностью смеси целлюлаз и суммой их индивидуальных активностей [135, 144]. Одним из факторов, влияющих на КС, является соотношение разных видов целлюлаз в реакционной смеси, например, КС между разными ЭГ и ЦБГ *Cryosporium lucknowense* варьирует от 2,03 до 3,25; КС между ЦБГ1 и ЦБГ2 составляет 2,75. Для целлюлазных комплексов с высоким содержанием ЭГ наличие ПМО обеспечивает высокий КС; для целлюлазных комплексов с высоким содержанием ЦБГ к существенному увеличению КС приводит наличие БГ [135, 140, 145, 146].

Свойства субстрата, его физико-химическая неоднородность тоже могут влиять на КС действия целлюлаз; целлюлоза, устойчивая к ферментативному разложению, может приводить к снижению КС [143, 147].

ГЕМИЦЕЛЛЮЛАЗЫ

Помимо целлюлаз для деструкции ВРБ используют гемицеллюлазы – ксиланазы, маннаназы и ксиланоглюканазы.

Важным ферментом для деструкции ксилана является эндо-1,4-β-ксиланаза (КФ 3.2.1.8). Она атакует основную цепь полимера в незамещенных областях, с образованием олигосахаридов. Заместители основной цепи отщепляются под действием гликозидаз или эстераз: α-L-арабинозильный остаток – под действием α-L-арабинофуранозидазы (КФ 3.2.1.55); D-глюкуроно- и 4-O-метилглюкуронозильные остатки – под действием α-глюкуронидазы (КФ 3.2.1.139); остатки уксусной, феруловой и *n*-кумаровой кислот – под действием ацетилксиланэстеразы и ферулоилэстеразы (КФ 3.1.1.72,

3.1.1.73). β -Ксилозидаза (экзо-деполимераза, КФ 3.2.1.37) гидролизует ксилоолигосахариды с невозстанавливающегося конца с образованием свободной D-ксилозы, сродство к ксилоолигосахаридам уменьшается с увеличением длины цепи олигомера. β -Ксилозидаза не функционирует при наличии бокового заместителя у концевого невозстанавливающего остатка ксилозы [148–151].

Многие ксиланолитические имеют мультидоменную структуру и содержат КД и ксилан-связывающий домен, соединённые линкером. Также как и в случае целлюлаз между ксиланолитическими ферментами проявляется синергизм, который обусловлен кооперативным эффектом между эндоксилазазами и ферментами, отщепляющими боковые заместители (например, ацетильный или арабинофуранозильный) или гидролизующих ксилоолигосахариды [152, 153]. Следует иметь в виду, что ксилоолигосахариды являются ингибиторами целлюлаз, поэтому наличие β -ксилозидаз важно для их деструкции и элиминирования ингибирующего эффекта [124].

К основным маннан-гидролизующим ферментам относятся эндо- β -манназа (К.Ф. 3.2.1.78), β -маннозидаза (К.Ф. 3.2.1.25) и β -глюкозидаза (К.Ф. 3.2.1.21), к дополнительным – ацетилманнанэстераза (К.Ф. 3.1.1.6) и α -галактозидаза (К.Ф. 3.2.1.22), гидролизующие боковые заместители основной цепи маннанов (и создающие новые доступные сайты для гидролиза основными ферментами маннанолитической системы) [154, 155].

Эндо- β -манназа расщепляет внутренние β -1,4-связи галакто- и галактоглюкоманнанов, глубина гидролиза которых зависит от степени и характера замещений основной цепи. β -Маннозидаза (экзо-деполимераза) гидролизует β -1,4-связи невозстанавливающего конца маннанов и маннаноолигосахаридов, ацетилманнанэстераза – боковые ацетильные группы галактоглюкоманнанов, α -галактозидаза удаляет α -1,6-присоединённые фрагменты D-галактозы боковой цепи галактоманнанов и галактоглюкоманнанов. Также как и ксилоолигосахариды манноолигосахариды являются ингибиторами целлюлаз, поэтому их деструкция β -маннозидазами элиминирует ингибирующий эффект [124].

Гидролиз β -1,4-глюкозидных связей основной цепи ксилоглюканов осуществляют эндо- β -1,4-глюканазы (К.Ф. 3.2.1.4, например ЭГ1 *T. reesei*, ЭГ3 и ЭГ5 *C. lucknowense*). Существуют ферменты, специфичные именно к ксилоглюкану (ксилоглюкан-специфический эндо- β -1,4-глюканазы, КФ 3.2.1.151), а также эндо-процессивные ксилоглюканазы (КФ 3.2.1.155) и специфические к восстанавливающему концу олиго-ксилоглюканов целлобиогидролазы (КФ 3.2.1.150) [156, 157].

УВЕЛИЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОЦЕССА
ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА ВРБ

Биотопливо 2 поколения имеет относительно высокую стоимость, это во многом определяется высокой стоимостью ферментов [3, 17]. В качестве мер по её снижению в литературе значительное внимание уделяется оптимизации состава ферментных комплексов и условий проведения процесса ферментативного гидролиза, совершенствованию и улучшению свойств индивидуальных ферментов (увеличению их каталитической активности и операционной стабильности), конструированию высокопродуктивных штаммов-продуцентов ферментов.

Оптимизация состава ферментного комплекса

По своему составу ферментный комплекс должен быть адаптирован к определённому виду ВРБ и способу предобработки, при этом он должен содержать основные ферменты – деструкторы целлюлозы (ЭГ, ЦБГ), вспомогательные ферменты (ПМО, БГ), а также ферменты-деструкторы гемицеллюлоз (ксилаказы, маннанызы и др.). Оптимизацию состава ферментного комплекса для биоконверсии разных видов ВРБ осуществляют, используя выделенные в гомогенном виде индивидуальные ферменты, подбирая качественный и количественный состав мультиферментной композиции с учётом синергического взаимодействия между её компонентами. Например, для деструкции целлюлозы оптимальный состав ферментного комплекса выглядит следующим образом: ЦБГ1 36–41 %, ЦБГ2 – 16–20%, ЭГ2 – 12–18 % (ферменты *P. verruculosum*), БГ *A. niger* – 5–11%, ПМО (EGIV *T. reesei*) – более 1%, но менее 24% [158]. С использованием гомогенных ферментов *C. lucknowense* было показано, что оптимальный ферментный комплекс для гидролиза микрокристаллической целлюлозы состоит из ЦБГ1а, ЦБГ1в, ЦБГ2, ЭГ2, ЭГ5, БГ и ксиланазы в соотношении 1:1:2:0,3:0,4:0,2:0,1; оптимальный комплекс для гидролиза предобработанной органозольвом древесины пихты состоит из ЦБГ1а, ЦБГ2, ЭГ2, и БГ в соотношении 2:2:0,8:0,2 [145]. Ферментный комплекс, позволивший осуществить практически 100%-ную конверсию свекловичного жома содержит ЦБГ, ЭГ, БГ, арабиноксилан-арабинофурангидролазу, пектинлиазу, полигалактуроназу (основные ферменты), а также эндо- или экзо-арабиназы, эндо-галактаназу, β-ксилозидазу, эндо-ксилазу и/или α-арабинофуранозидазу (вспомогательные ферменты) [127].

Далее осуществляется воспроизводство оптимального соотношения ферментов комплекса на уровне ферментных препаратов, получение которых, как и регулирование их состава реализуется,

как правило, за счёт создания с помощью ДНК-технологий рекомбинантных штаммов-продуцентов [128, 146, 158–160].

Коммерчески доступные ферментные препараты, выпускаемые лидирующими в области биоконверсии ВРБ биотехнологическими компаниями, например, Novozymes (препараты серии Cellic®) и DuPont Genencor (препараты серии Accelerase®) представляют собой ферментные композиции, продуцируемые рекомбинантными штаммами *Trichoderma* sp. и состоящие (в разном соотношении) из ЦБГ, ЭГ, БГ, ПМО, ксиланаз, β-ксилозидаз и других ферментов микроскопических грибов, таких как *T. longibrachiatum* и *T. reesei*, *A. niger* и пр. [132].

Оптимизация условий ферментативного гидролиза

После выбора состава ферментного комплекса проводят оптимизацию его дозировки, определяют возможность повторного использования ферментов, временную протяжённость процесса деструкции сырья, способ и скорость перемешивания реакционной смеси, подбирают значения pH, температуры, ионной силы, способа и последовательности внесения в реакционную смесь сырья с целью обеспечения максимальной его концентрации, определяют наличие ингибиторов, образующихся в процессе предобработки и способы их детоксификации, проводят поиск возможностей уменьшения непродуктивной адсорбции ферментов на лигнине [132, 159, 161–163].

Улучшение свойств ферментов

Одним из способов снижения затрат является поиск в природе или создание ферментов, которые обладают повышенной каталитической активностью, оптимальными для функционирования в заданных условиях pH- и температурным оптимумами, улучшенными эксплуатационными характеристиками, такими как операционная стабильность, уменьшенная чувствительность к ингибирующему действию моно- и олигосахаридов, продуктов деструкции лигнина и фурановых соединений, солей (например, используемых в ИЖ) или компонентов глубоких эвтектических растворителей, уменьшение непродуктивного связывания с лигнином.

Белковая инженерия ферментов, основными подходами которой являются рациональный дизайн и направленная эволюция, позволяет целенаправленно менять их свойства [164–166].

Метод рационального дизайна заключается в прогнозировании и осуществлении точечных а.к. замен, осуществление этого метода требует знания а.к. последовательности и пространственного строения белка, определение а.о., ответственных за связывание с субстратом,

за осуществление катализа и поддержание трехмерной структуры белка. Осуществление подобного анализа может быть основано на изучении кристаллографических данных о пространственном строении белка или на множественном выравнивании а.к. последовательности исследуемого белка с последовательностями уже изученных белков [164, 167]. Иллюстрацией возможностей этого подхода служит увеличение в 4 и 1,8 раза молекулярной активности ЭГ и ЦБГ *Chaetomium thermophilum*, увеличение в 5 раз активности БГ *T. harzianum* и существенное уменьшение чувствительности этого фермента к ингибирующему влиянию глюкозы [131]. Множественное выравнивание последовательностей ЦБГ1 из *Phanerochaete chrysosporium*, *T. reesei* и *Hemicola insolens* было использовано для выбора положений а.к. замен, последующее внесение мутаций в структуру ЦБГ1 из *T. reesei* и *H. insolens* позволило в несколько раз уменьшить степень ингибирования этого фермента глюкозой [168]. Моделирование трехмерных структур и выравнивание последовательностей ЦБГ2 из *Talaromyces emersonii* и *T. reesei* было использовано для выбора положений мутаций, приведших к уменьшению степени ингибирования активности ЦБГ2 *T. reesei* целлюбиозой [169]. В 1,5–2 раза была увеличена стабильность ЭГ2 *P. verruculosum* (при 70–80°C [170]); на 10°C увеличена температура плавления эндоглюканазы TgEgl5A *T. emersonii* с одновременным увеличением специфической активности в 1,6 раза; температура плавления ЦБГ2 *T. reesei* была увеличена на 10,4°C. К увеличению термостабильности химерного белка привёл такой приём как фьюжин КД мезофильной ЭГ с ЦСД термофильной ЦБГ [132].

Метод направленной эволюции заключается во внесении в структуру фермента множества случайных а.к. замен и поиске мутантных форм с улучшенными свойствами. Этот метод не предполагает наличие данных о структуре ферментов, однако требует проведения скрининга нескольких десятков или сотен тысяч мутантных форм белка на наличие положительных мутаций [171]. Метод направленной эволюции применяется при наличии простого и быстрого способа определения ферментативной активности, а также при возможности автоматизации процесса скрининга. Применение этого метода позволило увеличить каталитическую активность ЭГ *B. subtilis* в 5 раз [172], в 7 раз увеличить термостабильность ЭГ *Clostridium cellulovorans* [173], изменить значение pH-оптимума активности ЭГ3 *T. reesei* на 0,6 единиц [174], в 3,5 раза увеличить каталитическую активность β-глюкозидазы *P. furiosus* [175]. С помощью методов направленной эволюции была примерно в 13 раз увеличена специфическая активность метагеномной ЭГ CelA2, в

2,7 раза – ЦБГ-А *Cellulomonas fimi* [131]. В 3 раза была увеличена стабильность ЦБГ1 *T. emersonii* по отношению к ИЖ [ММММ][DMP] и [ЕММ][Ac], в 2 раза была увеличена стабильность целлюлаз *T. reesei* по отношению к [ВММ][С], была также увеличена стабильность целлюлолитических ферментов по отношению к морской воде [131].

Для увеличения каталитической активности методы белковой инженерии в большинстве случаев затрагивают как активный центр, так и поверхность белковой глобулы (КД и ЦСД), т.к. свойства поверхности определяют способность фермента связываться с нерастворимым субстратом. Кроме того, белковой инженерии подвергаются белковые петли, окружающие активный центр ЦБГ и принимающие участие в реализации такого свойства этих ферментов, как процессивность [176, 177].

Для увеличения термостабильности наиболее распространёнными подходами являются увеличение числа внутримолекулярных связей и увеличение жёсткости структуры белковой молекулы за счёт создания дисульфидных мостиков, гидрофобных ядер, увеличения стекинг-взаимодействия ароматических остатков, образования дополнительных водородных связей, ионных пар, добавления в последовательность остатков пролина и уменьшение энтропии денатурации, увеличения внутримолекулярного взаимодействия элементов вторичной структуры, уменьшения площади гидрофобных участков поверхности белковой глобулы, закрепления свободных концов а.к цепи [164, 178, 179].

Для целлюлаз и других грибных гликозидгидролаз характерно гликозилирование – N-гликозилирование для КД и O-гликозилирование для линкерного участка белковой молекулы. O-гликозилирование защищает пептидную цепь линкера от протеолиза, а оба типа гликанов способствуют повышению термостабильности ферментов. В последнее время стало ясно, что O- и N-связанные гликаны целлюлаз участвуют в катализе и процессах сорбции ферментов на целлюлозе. С помощью компьютерного моделирования показано, что O-гликаны в линкерах ЦБГ1 и ЦБГ2 *T. reesei* динамически взаимодействуют с молекулами кристаллической целлюлозы (на порядок более эффективно, чем линкеры без O-гликанов), что вносит вклад в каталитическую активность ферментов [16]. Удаление существующих сайтов N-гликозилирования в ЦБГ1 *P. funiculosum* или, наоборот, введение нового сайта N-гликозилирования методом сайт-направленного мутагенеза, приводит к увеличению активности фермента (до 70%) по отношению к кристаллической целлюлозе [180].

После осуществления точечных мутаций сайтов N-гликозилирования (замены остатков Asn на Ala) было установлено, что в зависи-

мости от местоположения N-связанных гликанов на поверхности КД рекомбинантных ЦБГ1 и ЦБГ2 *P. verruculosum* они могут влиять на активность ферментов по отношению к целлюлозе как положительно, так и отрицательно (эффект может достигать 84%) [181, 182]. N-гликаны, расположенные рядом с входом в «туннель» активного центра, отрицательно влияют на активность целлюбиогидролаз, затормаживая их процессивное движение по поверхности субстрата при последовательном отщеплении остатков целлюбиозы. Напротив, N-гликаны, расположенные на выходе из туннеля, увеличивают каталитическую активность ферментов по сравнению с их рекомбинантными формами, в которых N-гликаны в соответствующих позициях были удалены. Удаление N-связанных гликанов, расположенных рядом с входом и выходом из активного центра ЭГ2 *P. verruculosum*, также приводило к увеличению активности фермента по отношению к полимерным субстратам, однако эффект был менее выраженным (до 35%), чем в случае ЦБГ [183].

Основные методы увеличения эффективности процесса ферментативного гидролиза ВРБ систематизированы в табл. 4.

Одна из возможностей удешевления ферментов состоит в создании их высокоактивных продуцентов, кроме того, как будет более подробно показано ниже, к удешевлению приводит выбор расположения места производства ферментов для биоконверсии ВРБ.

VI. ПРОДУЦЕНТЫ ФЕРМЕНТОВ ДЛЯ БИОКОНВЕРСИИ ВРБ

Микроскопические мицелиальные грибы являются основным источником коммерческих целлюлаз, производимых в промышленном масштабе во многих странах мира, в том числе в России. Долгое время целлюлолитические грибы, относящиеся к роду *Trichoderma*, являлись лидерами по секреции наиболее активных целлюлаз [16, 17]. Коммерческие препараты целлюлаз на основе мутантных штаммов *T. reesei* (синоним *Hypocrea jecorina*) и сейчас наиболее распространены на рынке ферментов. Поэтому неудивительно, что большинство исследований и разработок по получению биотоплива 2 поколения были основаны на использовании целлюлаз *T. reesei*: десятилетия исследований в академических и прикладных лабораториях обеспечили выходы внеклеточного белка, превышающие 100 г/л [184]. Продуктивность штамма была увеличена с помощью методов мутагенеза и селекции, а также оптимизации условий ферментации, состава питательной среды и удешевления её компонентов. Кроме того, полное секвенирование генома, разработка молекулярного

Таблица 4. Основные методы увеличения эффективности процесса ферментативного гидролиза ВРБ

Принцип	Методы	Результаты
Оптимизация состава ферментного комплекса	Оптимизация компонентного состава ферментного комплекса с использованием гомогенных ферментов с учётом синергитического взаимодействия. Выбор ферментов для определённого вида ВРБ, а также метода предобработки.	Снижение расхода ферментов
Оптимизация условий гидролиза	Снижение дозировки ферментов, повторное использование ферментов, уменьшение длительности процесса. Определение способа и скорости перемешивания реакционной смеси. Оптимизация значений рН, температуры, ионной силы, концентрации, способа и последовательности внесения в реакционную смесь субстрата для достижения максимальной концентрации по с.в. Детоксификация ингибиторов, образующихся в процессе предобработки.	Увеличение выхода сахаров
Снижение ингибирования ферментов	Достижение максимального превращения целло- и ксило-олигосахаридов и целлобиозы в моносахариды для уменьшения степени ингибирования ферментов. Превращение сахаров в другие продукты (этанол) за счёт совмещения процессов гидролиза и ферментации. Уменьшение непродуктивной адсорбции ферментов на лигнине.	Увеличение степени конверсии сырья
Улучшение свойств ферментов	Белковая инженерия ферментов для увеличения молекулярной активности и операционной стабильности, для уменьшения чувствительности к ингибированию сахарами и лигнином.	Увеличение активности и стабильности ферментов
Конструирование штаммов-продуцентов ферментов	Увеличение продуктивности штаммов. Оптимизация условий культивирования. Поиск новых штаммов-продуцентов. Конструирование рекомбинантных штаммов, позволяющих получать ферментные комплексы с заданным составом.	Снижение стоимости ферментов
Местоположение производства ферментов	Изготовление ферментов на месте их применения (on site) вместо производства на удалённом заводе (off site).	Снижение стоимости ферментов

инструментария для генной инженерии *T. reesei*, исследования регуляции экспрессии различных генов, индукции и репрессии, позволяют успешно использовать этот гриб как организм-хозяин для высокоэффективной экспрессии рекомбинантных ферментов и их ансамблей для биоконверсии ВРБ [69, 185].

Ферменты *T. reesei* хорошо охарактеризованы, комплекс внеклеточных ферментов представляет собой относительно простой, но высокоэффективный репертуар гликозидгидролаз. По сравнению с другими мицелиальными грибами геном *T. reesei* характеризуется относительно малым количеством генов, кодирующих целлюлазы и гемицеллюлазы – в нём обнаружено десять генов, кодирующих целлюлазы (8 ЭГ и 2 ЦБГ), принадлежащие к различным семействам гликозидгидролаз, из них только четыре фермента, как правило, секретируются в больших количествах – это ЦБГ1, ЦБГ2, ЭГ1 и ЭГ2 [16], они составляют до 90–95% от общего внеклеточного белка, при этом содержание ЦБГ1 достигает 50–60%, а ЦБГ2 ~20% [186, 187]. Две ЭГ, которые ранее считались гликозидгидролазами б1-го семейства, сейчас переклассифицированы как ПМО семейства АА9 [188]. Были идентифицированы до двенадцати генов, кодирующих БГ, однако большинство из них являются внутриклеточными белками, из-за чего для этого гриба характерен низкий уровень секреции БГ.

С помощью ДНК-технологий с использованием *T. reesei* как организма-хозяина была реализована стратегия добавления или замены компонентов в составе ферментного комплекса, а также улучшения характеристик индивидуальных ферментов, осуществляющих деструкцию ВРБ. Это позволило создать новые продуценты комплексов ферментов с увеличенной активностью по отношению к ВРБ по сравнению с исходным [189]. В состав таких комплексов помимо гомологичных модифицированных целлюлаз с улучшенными свойствами, входят гетерологичные ПМО, БГ, ксиланазы, β -ксилозидазы, другие гемицеллюлазы.

Компания Novozymes на основе штамма-продуцента *T. reesei* на смену стандартному целлюлазному коммерческому препарату Celluclast 1.5L создала серию новых высокоэффективных препаратов серия Cellic® с различными свойствами, предназначенными для биоконверсии ВРБ. Препарат Cellic® НТес разработан для гидролиза гемицеллюлозных субстратов; препараты серии Cellic® СТес (СТес1 и СТес2) – для глубокого гидролиза целлюлозы. Выпущенный в 2011 г. препарат третьего поколения (Cellic® СТес3), способный к биоконверсии как целлюлозы, так и гемицеллюлоз [146, 190].

Компания DuPont Genencor вместо традиционных целлюлазных и ксиланазных препаратов серий Spezyme и Multifect создала

для биоконверсии серию ферментных препаратов Accellerase®. Accellerase® TRIO используется для эффективного гидролиза сырья, содержащего целлюлозу и гемицеллюлозы, продуктами его действия являются С6 и С5 сахара. Препарат Accellerase® 1500 предназначен для глубокой конверсии целлюлозы, препарат Accellerase® XY содержит преимущественно ксиланазы [190].

В результате компании Novozymes и DaPont Genencor сообщают, что им удалось в 30 раз снизить стоимость ферментов (благодаря 6-кратному увеличению активности ферментов и 5-кратному сокращению издержек производства [191]).

Перспективными продуцентами высокоактивных целлюлазных комплексов являются некоторые виды грибов из рода *Penicillium* (*P. funiculosum*, *P. oxalicum*, *P. jantinelum*, *P. decumbences*, *P. verruculosum* и др.). Ферменты *Penicillium*, как правило, превосходят ферменты *T. reesei* по скорости гидролиза и выходу глюкозы из различных видов ВРБ при одинаковой дозировке по концентрации белка или целлюлазной активности, что неоднократно отмечалось различными исследователями начиная с середины 1990-х годов [16, 17, 69, 160, 185, 192, 193]. Секвенирование и аннотация геномов *P. decumbens*, *P. funiculosum*, *P. verruculosum* показало, что эти виды грибов отличаются более богатым набором ферментов, катализирующих расщепление компонентов ВРБ, по сравнению с *T. reesei* [194]. Ферментный комплекс, секретируемый *P. verruculosum*, содержит более 20 ферментов, различающихся по биохимическим и каталитическим свойствам. Основными целлюлазами, являются ЦБГ1, ЦБГ2, ЭГ1, ЭГ2а, ЭГ2b, ЭГ3 и БГ; содержание ЦБГ1 составляет около 35%, ЦБГ2 – 21–33%, общее содержание ЭГ варьирует от 2 до 5%, доля БГ составляет 3–4%. Кроме целлюлаз в состав ферментного комплекса входят и другие карбогидразы (суммарно 18–30% от общего белка) – ксиланазы, ксилоглюканазы, α -галактозидаза и глюкоамилаза [16].

Одной из причин высокой эффективности целлюлазного комплекса *P. verruculosum* является более высокая удельная активность его ключевых компонентов, чем у *T. reesei* и менее значительное ингибирование ферментов лигнином, а также более высокий уровень внеклеточной β -глюкозидазной активности [16].

Из дикого целлюлолитического штамма *P. verruculosum* WA30 с помощью ряда последовательных шагов мутагенеза и последующей селекции был получен высокопродуктивный штамм *P. verruculosum* B221-151 [195], из которого далее, также путём мутагенеза, получен реципиентный штамм *P. verruculosum* B1-537 ($\Delta niaD$), сохранивший высокую секреторную способность предшественника (до 50–60 г/л внеклеточного белка). Этот штамм является ауксотрофом с дефектом в

гене *niaD*, кодирующем нитратредуктазу, которая принимает участие в ассимиляции нитратного азота. У штамма *P. verruculosum* 537 (Δ *niaD*) редуцирован катаболизм глюкозы за счет случайной мутации в репрессоре CreA, что даёт возможность культивировать его, используя глюкозу в составе питательной среды, а также в режиме с подпиткой глюкозой. Биосинтез целлюлаз (и ксиланаз) этого штамма, как и в случае *T. reesei*, индуцируется целлюлозой, а также целлобиозой и гентиобиозой (в случае *T. reesei* – софорозой и лактозой). Целлобиоза является репрессором транскрипции генов, ответственных за продукцию шести основных целлюлаз и ксиланаз *Penicillium* [17].

Важной особенностью реципиентного штамма *P. verruculosum* B1-537 (Δ *niaD*) является сохранение способности продуцировать комплекс внеклеточных целлюлаз с высокой гидролитической активностью. Поэтому целлюлазный комплекс *P. verruculosum* применяют для биоконверсии ВРБ и превращения её С6 и С5 сахара [16, 17, 160], при этом использование возможностей экспрессионной системы *P. verruculosum* позволяет изменять содержание тех или иных ферментов комплекса или вводить в его состав новые [146].

Отметим, что коммерческие препараты целлюлаз на основе грибов рода *Penicillium* производятся в промышленном масштабе компанией Adisseo во Франции (препарат Rovabio® Excel на основе *P. funiculosum*), в Китае производятся ферментные препараты на основе *P. decumbens* [16], в России компанией Агрофермент с помощью различных модификаций штаммов *P. verruculosum* производятся целлюлазы и ксиланазы (препараты Агроцелл Плюс, Агроксил Плюс, Агроксил Премиум и другие) [196].

Среди альтернатив *T. reesei* следует также отметить такие продуценты, как целлюлолитический гриб *Myceliophthora thermophila* (ранее названный *Chrysosporium lucknowense*), из которого благодаря исследованиям и разработкам, осуществлённым компанией Dyadic International (США) был создан обладающий высокой продуктивностью мутантный штамм-продуцент целлюлаз, а также экспрессионная система. Штамм *M. thermophila* был использован компанией Abengoa Bioenergy (Испания) для реализации коммерческих проектов по получению биотоплива 2 поколения [16, 185]. Компания DSM (Нидерланды) использует ферменты для биоконверсии ВРБ, продуцируемые микроскопическим грибом *Talaromyces emersonii*. Высоким целлюлолитическим потенциалом также обладают грибы, принадлежащие к родам *Acremonium*, *Chaetomium*, *Humicola*, *Fusarium*, *Thermoascus*. Кроме того, коммерческие промышленные штаммы *Aspergillus*, хотя и не обладают высокой целлюлазной активностью, но часто используются в качестве источника БГ, гемицеллюлаз, пектиназ и других ферментов [16, 186].

VII. ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ БИОЭТАНОЛА

Известны несколько вариантов технологии осуществления процесса получения биотоплива 2 поколения, каждый из которых имеет свои преимущества и ограничения. При реализации процесса используются разные комбинации видов растительного сырья и способов его предобработки, ферментных препаратов и микроорганизмов, используемых на стадии ферментации сахаров. Тем не менее, выбор технологии во многом обусловлен обеспечением максимально эффективного использования ферментов.

Важным параметром является суммарная загрузка сырья в реакционной смеси – это необходимо для достижения финального титра этанола – не менее 5–6%, в противном случае затраты на дистилляцию для удаления воды будут непомерно высокими. Концентрация сырья должна быть 20–30% по с.в., однако в этом случае эффективное перемешивание реакционной смеси затруднено или вовсе невозможно из-за высокой вязкости вследствие водо-удерживающих свойств лигноцеллюлозы. Первые часы ферментативного гидролиза требуют сравнительно высоких энергозатрат на перемешивание – до тех пор, пока длина волокон сырья и объемная вязкость реакционной смеси не уменьшится за счёт ферментативной деструкции (в первую очередь – за счёт действия ЭГ) [69, 124, 125].

В результате предобработки может происходить гидролиз гемицеллюлоз, что создаёт технологический поток C5 сахаров, кроме того, могут образовываться токсичные для ферментов и микроорганизмов продукты. Учитывая это, желательно ввести стадию разделения твёрдой и жидкой фракций после предобработки ВРБ. Потоки C5 и C6 сахаров могут быть объединены после ферментативного гидролиза целлюлозы, или же пентозы и гексозы можно использовать порознь.

Рассмотрим различные подходы, используемые в технологии получения биоэтанола.

Раздельный гидролиз и ферментация (separate hydrolysis and fermentation, SHF) предусматривает осуществление ферментативного гидролиза предобработанной ВРБ как отдельной стадии при температуре оптимальной для действия ферментов – 45–60°C (как правило грибные целлюлазы и гемицеллюлазы имеют температурный оптимум 50°C). Ферментацию сахаров далее тоже проводят как отдельную стадию с помощью штаммов дрожжей или бактерий при более низкой температуре, оптимальной для используемого вида микроорганизмов (обычно 30–35°C). При реализации SHF подхода процессы ферментативного гидролиза и ферментации можно оптимизировать независимо друг от друга, в случае гидролиза

выбрать соответствующие режимы (периодический, с подпиткой субстратом, непрерывный); в случае ферментации подобрать нужный регламент процесса при необходимости сбраживания гексоз и пентоз, и т.д. В качестве недостатков этого подхода можно отметить риск ингибирования ферментов продуктами гидролиза, большую совокупную длительность процесса, увеличенную потребность в использовании ёмкостного оборудования, что, в итоге, приводит к увеличению капитальных затрат [49].

Одновременный гидролиз и ферментация (simultaneous saccharification and fermentation, SSF) – в данном случае процесс ферментативного гидролиза предобработанной ВРБ и ферментации сахаров проходят в одну стадию, одновременно. Этот подход позволяет решить такую проблему как ингибирование ферментов при высокой концентрации сахаров, поскольку они потребляются сразу по мере их получения; кроме того предотвращается «непродуктивное» расходование сахаров на процессы трансгликозилирования и конденсации, осуществляемое β -глюкозидазой (которые интенсифицируются при высокой концентрации глюкозы). Сокращается суммарная длительность процесса, уменьшается общий объём используемого оборудования. Недостатком процесса является необходимость его проведения при температуре, оптимальной для процесса ферментации (для действия дрожжей или бактерий), т.е. при температуре ниже оптимальной для ферментов. Увеличивается риск контаминации процесса по сравнению с вариантом SHF, когда процесс ферментативного гидролиза проходит при более высокой температуре. Кроме того, некоторые ферменты могут ингибироваться при повышении концентрации этанола в среде [69, 167].

Гибридный гидролиз и ферментация (hybrid hydrolysis and fermentation, HHF) представляет собой комбинация процесса SHF и SSF и позволяет использовать преимуществ двух приведённых выше подходов. Ферментативный гидролиз предобработанной ВРБ в течение определённого периода времени осуществляется в условиях, оптимальных для функционирования ферментов (например, при 50°C); на второй стадии по достижении заданной степени гидролиза ВРБ инициируется процесс ферментации со сменой условий протекания процесса на оптимальные для ферментации сахаров в этанол (и снижением температуры, например, до 32°C). Иными словами, на первой стадии процесс биоконверсии ВРБ идёт по схеме SHF, на второй – по схеме SSF, что позволяет объединить достоинства обоих методов и устранить недостатки, т.е. решить проблему несовместимости оптимальных условий процесса гидролиза и ферментации, ингибирования ферментов при высоких концентрациях сахаров,

ингибирования ферментов этанолом. Важными факторами при реализации процесса ННФ являются выбор возможностей интенсификации процесса ферментативного гидролиза ВРБ и момента добавления микроорганизмов для переключения процесса с гидролиза на гидролиз-ферментацию.

Консолидированный биопроцесс (consolidated bioprocess, СВР) – это процесс, в котором стадии получения ферментов, гидролиза полисахаридов и ферментации сахаров в целевые продукты осуществляются в одном реакторе [197]. СВР направлена на снижение затрат на производство этанола или других продуктов биоконверсии ВРБ, позволяет решить проблему ингибирования ферментов продуктами гидролиза, открывает возможность использования ферментов, связанных с клеточной стенкой микроорганизмов, поскольку они находятся в непосредственном контакте с полисахаридными субстратами.

Для осуществления консолидированного биопроцесса в идеале можно использовать один организм, способный синтезировать целлюлазы и целевой продукт биоконверсии одновременно (или создать таковой с помощью методов синтетической биологии). В рамках этого подхода осуществляют генетическую модификацию целлюлолитического микроорганизма для интродукции биохимических путей конверсии сахаров в этанол. В этом случае необходимо, помимо прочего, решение проблемы токсичности этанола для такого микроорганизма. Можно также осуществить экспрессию ферментов в организме, который хорошо приспособлен для получения этанола, например в дрожжах *S.cerevisiae*, в том числе способных к конверсии в этанол как С6, так и С5 сахаров. В этом случае необходимо обеспечить достижение высоких титров экспрессии целлюлолитических ферментов [198].

Можно также применять смешанную культуру (или консорциум микроорганизмов) – тогда должен быть найден оптимум условий для их комбинированного применения. В качестве примера использования смешанной культуры можно привести процесс прямого получения итаконовой кислоты из целлюлозы. Синтез итаконовой кислоты осуществляется с помощью гриба *A. terreus* для которого оптимальными или компромиссными значениями температуры являются 30–40°C и рН 3,7. В качестве наиболее подходящего второго участника консорциума среди ряда целлюлолитических грибов (*T. reesei*, *M. thermophila*, *Telavia terrestris*, *P. verruculosum*) был выбран последний как имеющий наиболее близкие к указанным для *A. terreus* параметры культивирования [199].

В табл. 5 систематизированы возможности различных технологий биоконверсии ВРБ.

Таблица 5. Сравнительный анализ различных технологий биоконверсии ВРБ

Технология	Признаки	Достоинства	Ограничения
Раздельный гидролиз и ферментация (separate hydrolysis and fermentation, SHF).	Ферментативный гидролиз предобработанной ВРБ и ферментация сахаров проходят раздельно на последовательных стадиях.	ВРБ гидролизуется в оптимальных для функционирования ферментов условиях (температура, pH, концентрация субстрата, длительность процесса). Ферментация проходит в оптимальных для микроорганизмов условиях. Процессы гидролиза и ферментации легко оптимизировать.	Ингибирование ферментов сахарами. Большая совокупная длительность процесса. Увеличенная потребность в использовании ёмкостного оборудования. Высокие капитальные затраты.
Одновременный гидролиз и ферментация (simultaneous saccharification and fermentation, SSF).	Процесс ферментативного гидролиза предобработанной ВРБ и ферментации проходят в одну стадию, одновременно.	Решается проблема ингибирования ферментов сахарами. Уменьшается длительность процесса, снижается потребность в ёмкостном оборудовании, уменьшаются затраты.	Процесс гидролиза проходит в условиях не оптимальных для действия ферментов. Риск контаминации увеличен. Ферменты могут ингибироваться этанолом.
Гибридный гидролиз и ферментация (hybrid hydrolysis and fermentation, HHF).	Ферментативный гидролиз предобработанной ВРБ в течение определённого времени осуществляется в условиях, оптимальных для функционирования ферментов; на второй стадии инициируется процесс ферментации.	Решаются проблемы ингибирования ферментов сахарами и этанолом, а также несовместимости оптимальных условий процесса гидролиза и ферментации.	Возрастают требования к интенсивности процесса ферментативного гидролиза. Необходимо точно выбирать момент переключения процесса с режима гидролиза на режим гидролиза – ферментации.
Консолидированный биопроцесс (consolidated bioprocess, CBP).	Биосинтез ферментов, гидролиз предобработанной ВРБ и ферментация осуществляются в единой технологической стадии.	Наиболее привлекательный с экономической точки зрения процесс, поскольку все фазы биоконверсии ВРБ объединены в одном процессе.	Требуется увеличение эффективности процесса.

VIII. ПРИМЕРЫ МАСШТАБИРОВАНИЯ ПРОЦЕССОВ ПОЛУЧЕНИЯ БИОЭТАНОЛА

Идея получения биотоплива 2 поколения с использованием ВРБ в качестве сырья весьма популярна в Европейских странах, США, Канаде, Латинской Америке и Китае. В ряде стран реализованы на практике крупномасштабные процессы биоконверсии ВРБ с получением биоэтанола [16, 48, 69, 200].

В данном случае уместно отметить, что этанол может быть использован не только как топливо, но каталитическим путём может быть превращён в этилен, пропилен, бутилены, этиленоксид, этиленгликоль и другие эфиры, этаноламины и другие соединения [2].

Ниже будут приведен (не полный) перечень примеров производства биоэтанола из ВРБ. Общая схема процесса приведена на рисунке.

Флагманским является завод в г. Крещентино, Италия, мощностью 60 тыс. т этанола в год, построенный в 2012 г. в результате партнёрства между компаниями Novozymes и Beta Renewables. Технология производства биотоплива 2 поколения получила название Proesa® [201, 202] и была первоначально апробирована и оптимизирована на пилотной установке в г.Ривалто, Италия (2009 г., мощностью 1 т перерабатываемой ВРБ в сутки). В качестве сырья на заводе в г. Крещентино использовали пшеничную и рисовую солому (270 тыс. т в год), предобработанные с помощью парового взрыва без применения химикатов. Получение сахаров осуществляли с помощью ферментных препаратов серии Cellic® CTec в виде культуральной жидкости без отделения клеток продуцента. Технология Proesa® предусматривает совместный гидролиз и ферментацию (причём сбраживаются С6 и С5 сахара); остатки лигнина сжигаются для получения энергии.

В настоящий момент завод в Крещентино не функционирует, но с использованием его опыта и базовой технологии в 2014 г. был построен завод GranBio в г. Алагос, Бразилия (стоимостью \$265 млн) мощностью около 68 тыс. т этанола в год, в качестве сырья используется багасса [203].

Ещё один завод в Бразилии в г. Пирацициба мощностью 35 тыс. т этанола был построен компаниями Raizen и Iogen в 2014 г.; завод использует багассу и солому, предобработанные паровым взрывом. В обоих случаях используются ферменты Novozymes.

Испанская компания Abengoa Bioenergy в 2014 г. создала завод по получению этанола в г. Хьюдлтоне, штат Канзас, США мощностью около 90 тыс. т этанола, общие расходы на реализацию проекта составили \$685 млн [204]. В качестве сырья используют преимущественно стебли кукурузы 80%, а также пшеничную солому и

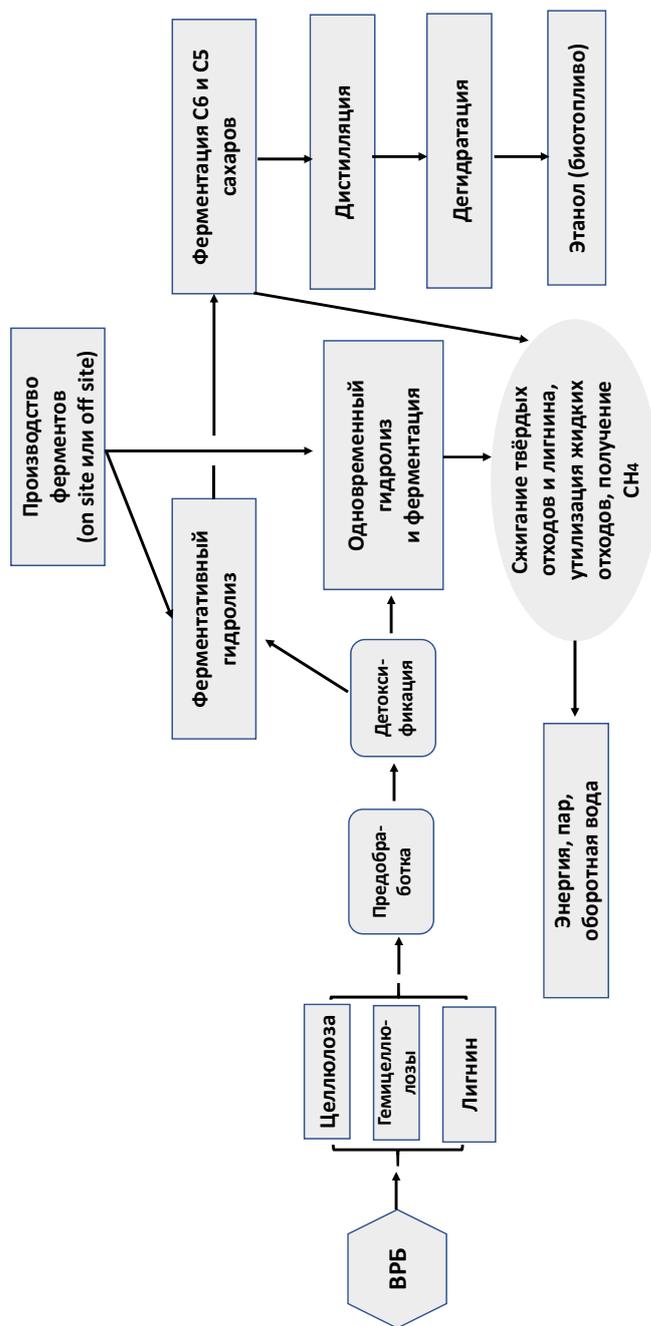


Рис. Схема процесса производства биотоплива 2 поколения.

другие сельскохозяйственные отходы, предобработанные с помощью парового взрыва с применением кислоты. Для гидролиза применяют ферменты, продуцируемые *M. thermophila*. Перед открытием этого завода технология была испытана и оптимизирована на пилотном заводе в г. Йорке, штат Небраска, США (2007 г.) мощностью 330 т этанола где в качестве сырья использовали стебли кукурузы, а также – на демонстрационном заводе в г. Саламанка, Испания, мощностью около 4,2 тыс. т, сырьё – солома пшеницы и ячменя.

Следует отметить, что компания Abengoa Bioenergy уделяет получению биотоплива большое внимание – она построила в 2010 г. крупнейший в мире завод по получению биотоплива 1 поколения из зерна в г. Роттердаме, Нидерланды (1,2 млн т в год пшеницы и кукурузы в качестве сырья, 577 млн. л этанола в год) [204].

Компания DuPont 2015 г. построила самый большой в мире завод по производству биотоплива 2 поколения в г.Невада, штат Айова, США, расходы на строительство которого составили \$225 млн. Мощность завода – 113 тыс. т этанола. Процесс включает несколько стадий – грубое измельчение растительного сырья, щелочную предобработку (предположительно с помощью аммиачного взрыва на основе AFEX-процесса), отдельные ферментативный гидролиз и ферментацию, выделение этанола и утилизацию отходов. Для гидролиза используют ферментные препараты серии Accellerase®, сбраживание С6 и С5 сахаров осуществляют с помощью бактерий *Z. mobilis*. Компания DuPont заключила лицензионный договор с компанией New Tianlong Industry на строительство завода по производству биотоплива 2 поколения в Китае. В 2019 г. был подписан Меморандум о взаимопонимании между компаниями DuPont, Ethanol Europe и правительством Македонии о проектировании завода по получения биотоплива 2 поколения [205].

Компания Poet-DSM Advanced Biofuels в 2014 г. создала в г. Эмметс-бурге, штат Айова, США полномасштабный демонстрационный завод по производству биотоплива 2 поколения мощностью 75–95 тыс. т этанола из стеблей кукурузы и других её отходов (потребность в сырье составляет до 300 тыс. т) по технологии, получившей название LIBERTY [206]. Расходы на строительство завода составили \$250 млн. Технология предусматривает предобработку сырья с помощью парового взрыва с использованием разбавленной серной кислоты (Advanced Steam-Ex™ process, разработанный компанией ANDRITZ) с отделением потока пентоз; отдельные гидролиз и ферментацию. Для гидролиза используются ферменты с увеличенной активностью и термостабильностью (продуцируемые грибом *T. emersonii*), которые производятся on site непосредственно на заводе по получению

этанола. Процесс ферментации осуществляется с помощью дрожжей *S. cerevisiae*, утилизирующих С6 и С5 сахара (как ксилозу, так и арабинозу). Этанол (99,5%) получают с помощью дистилляции и дегидратации. Лигнин сжигается для получения энергии, жидкие отходы подвергаются очистке с помощью последовательной аэробной и анаэробной ферментации с последующим сжиганием метана. Предполагается продажа лицензий на технологию LIBERTY, а также использование технологии на некоторых из 27 принадлежащих компании РОЕТ заводов по производству биотоплива 1 поколения из зерна кукурузы. Отметим, впрочем, что 2019 г. деятельность завода г. Эмметсбурге приостановлена для дальнейшего усовершенствования технологии [207].

Датская компания Inbicon в течение длительного времени разрабатывала процесс получения биотоплива 2 поколения, создав технологию Inbicon Biomass Refinery™, заключающуюся в гидро-термической предобработке растительного сырья без использования химических агентов (в качестве токсиканта образуется только уксусная кислота, нейтрализация и детоксификация которой происходит с помощью аммиака), отдельным гидролизе и ферментации (глюкозы), выделении 99,5% этанола, очистке стоков с выделением лигнина и получением биогаза. Для гидролиза используются как ферментные препараты Cellic® CTec3 Novozymes, так и Accellerase®TRIO DuPont Genencor, процесс гидролиза осуществляется в горизонтальных реакторах при использовании высокой нагрузки по с.в. предобработанного сырья (до 30%), для уменьшения непродуктивной сорбции ферментов на лигнине в реакционную смесь добавляют ПАВы и ПЭГ. Ферментацию глюкозы проводят с помощью дрожжей в нестерильном режиме. Ксилозу (С5-мелассу) используют в качестве кормовой добавки, а также для получения метана (при этом предусматривается возможность сбрасывания ксилозы в этанол), лигнин – для получения тепла и пара, а также топливных пеллетов. Весь процесс осуществляется без потребления внешней энергии. В конце 1990-х годов Inbicon создала лабораторную установку (<10 кг сырья в сутки), в 2003 г. – пилотную установку (2,4 т), в 2009 – пилотную установку увеличенного масштаба (24 т), в 2009 г. в г. Калундборг, Дания был открыт демонстрационный завод мощностью 100 т сырья в сутки на котором в течение нескольких лет проводилась оптимизация технологических режимов, использовались разные ферментные препараты, различные виды сырья (пшеничная солома, кукурузные стебли, багасса и др.). Демонстрационный завод позволяет перерабатывать 30 тыс. т соломы в год и получать в качестве продуктов 4,5 тыс. т этанола (99,5%), 11250 т С5-мелассы

(с содержанием 65% ксилозы) и 13100 т лигнина в пеллетах. Стоимость демонстрационного завода составила примерно €65 млн. На основании результатов его эксплуатации планируется создание полномасштабного завода по переработке 1200 т сырья в сутки [208].

Компания Clariant создала технологию конверсии ВРБ в биоэтанол, получившую название SUNLIQUID®, проведя в течение семи лет её оптимизацию на демонстрационном заводе в г. Страубинг, ФРГ, мощностью 1000 т этанола в год (4500 т сырья), на котором были воспроизведены все этапы производственного процесса – предобработка (термообработка – паровой взрыв без применения химикатов), отдельный гидролиз и ферментация (для ферментации применяются дрожжи, способные сбраживать как С6, так и С5 сахара), в качестве сырья были использованы различные виды соломы, багасса, мискантус, свекловичный жом [209]. В настоящий момент осуществляется строительство завода в Румынии мощностью 50 тыс. т этанола, подписаны лицензионные соглашения на строительство заводов в Словакии, Польше и Китае. В последнем случае строительство завода предполагается в провинции Фуян, предусматривается удвоение мощности завода до 100 тыс. т этанола в год [210].

IX. ЭКОНОМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПРОЦЕССОВ ПОЛУЧЕНИЯ БИОЭТАНОЛА

В работе [211] было проведено моделирование процесса получения биотоплива второго поколения с целью оценить, насколько разные факторы влияют на минимальную цену продажи этанола (minimum ethanol selling price, MESP, представляющую собой стоимость этанола после уплаты всех налогов и с учётом 10%-ной нормы прибыли производителя). Моделирование проводили на примере завода, перерабатывающего 2000 т по с.в. в сутки кукурузных стеблей (8410 операционных часов в год). Предполагается, что предобработка сырья осуществляется с помощью разбавленной серной кислоты (с последующей детоксификацией ингибиторов), применяется технология одновременного гидролиза и ферментации (SSF) на которой могут быть использованы как произведённые на месте (on site) ферменты, так и ферменты, приобретённые на рынке (off site). После получения этанола следуют стадии дистилляции и последующей дегидратации с помощью молекулярных сит (с получением 99,5% этанола). Твёрдая фракция после стадии дистилляции используется для получения энергии и пара, жидкие отходы подвергается последовательной аэробной/анаэробной переработке с получением биогаза (который сжигается на заводе для получения

энергии и пара). Продуцентом используемых для получения сахаров ферментов является гриб *T. reesei*, а получение этанола осуществляется с помощью бактерий *Z. mobilis* сбраживающих как С6, так и С5 сахара. Схему моделируемого процесса отражает рисунок.

Для оценки стоимости ферментов рассмотрены несколько вариантов off site производства (цены приведены за 1 кг белка): вариант 1 – стоимость ферментов принята за цену соевого белка (\$1,25/кг); вариант 2 – за усреднённую себестоимость культуральной жидкости с содержанием белка 10% – \$507 за 1 м3 (\$5,07/кг); вариант 3 – за среднюю цену коммерческих грибных целлюлаз (\$10,14/кг); вариант 4 – за среднюю цену ферментов на рынке Китая (\$23,3/кг). Кроме того, рассмотрен вариант 5, соответствующий производству ферментов on site – стоимость ферментов принята за \$4,24/кг (расчёт был сделан при условии использования глюкозы, полученной на заводе как источника углеводов).

Моделирование показало, что MESP варьирует от \$1,89 до \$3,46/гал этанола в зависимости от цены на ферменты; вклад ферментов в MESP составляет от 4,7 до 48% (табл. 6). Наименьшее влияние цены ферментов на MESP соответствует варианту 1 (ферменты по цене соевого белка), однако этот сценарий представляется мало реалистичным; наибольшее влияние – варианту 4 (по цене коммерческих китайских ферментов).

Таблица 6. Влияние стоимости ферментов на минимальную цену продажи этанола

	Производство ферментов off site, варианты				Производство ферментов on site
	1	2	3	4	Вариант 5
Цена фермента, \$/кг белка	1,25	5,07	10,14	23,30	4,24
Стоимость фермента, \$/гал этанола	0,09	0,40	0,81	1,66	0,34
Стоимость сырья, \$/гал этанола	0,74	0,74	0,74	0,74	0,74
Стоимость процесса биоконверсии, \$/гал этанола	1,06	1,06	1,06	1,06	1,07
MESP, \$/гал этанола	1,89	2,20	2,61	3,46	2,15
Вклад стоимости ферментов в MESP, %	4,70	18	31	47,9	15,8

Вариант 5 с производством ферментов on site является наиболее привлекательным, вклад ферментов в MESP составляет 16% (отметим, что в этом случае происходит незначительное увеличение стоимости процесса биоконверсии ВРБ вследствие создания мощностей для производства ферментов). On site способ производства ферментов для заводов по получению биотоплива 2 поколения позволяет существенно сэкономить за счёт отсутствия издержек на логистику, а также в результате исключения процессов down stream – т.е. концентрирования и очистки ферментных препаратов, процессов удаления биомассы клеток продуцента (которые утилизируются на стадии получения этанола). В момент проведения моделирования цена топливного этанола на рынке США составляла \$2,31 (на 2016 год [211]), что делает вариант 5 с on site способом производства ферментов наиболее жизнеспособным. Отметим, что на июль 2020 г. цена за галлон топливного этанола варьировала от \$1,98 (США) до \$6,56 (Испания) [212].

К варианту on site производства ферментов близок вариант 2 (использование фермента по себестоимости его производства off site) – вклад в MESP составляет 18%.

Для расчётов, результаты которых приведены в табл. 6 было принято, что процесс биоконверсии ВРБ реализуется по сценарию «золотого стандарта NREL» (National Renewable Energy Laboratory) [191, 213, 214], а именно – дозировка ферментов составляет 20 мг белка на 1 г целлюлозы, исходная концентрация предобработанного субстрата в процессе SSF – 20% по с.в., бактерии *Z. mobilis* утилизируют при брожении 95% глюкозы, 85% ксилозы и 85% арабинозы. Этот вариант соответствует модификации 1 процесса биорефайнинга (табл. 7 – в этой таблице приведены данные, демонстрирующие влияние различных параметров процесса производства этанола на MESP). Модификация 2 процесса предполагает, что арабиноза не сбраживается; модификация 3 – конверсия ксилозы в этанол составляет 40%, арабиноза не сбраживается; модификация 4 – ксилоза и арабиноза не сбраживаются; модификация 5 – конверсия целлюлозы в глюкозу составляет 85%, конверсия глюкозы в этанол – 90%, ксилоза и арабиноза не сбраживаются.

По оценке [211] реализация процесса по модификации 1 представляется трудно достижимым, а модификации 2 и 3 наиболее точно отражают сложившуюся к настоящему времени ситуацию, обусловленную неполной конверсией ксилозы и арабинозы клетками *Z. mobilis*. Значение MESP как 2,61 \$/гал этанола, соответствующее модификации процесса 3 при производстве ферментов on site, является критическим с учётом цены топливного этанола \$2,31 (в ценах 2016 г.). Если использовать коммерческие ферменты, произве-

дённые off site по ценам на рынке Китая, то шансов на прибыльность производства этанола не остаётся ни при каком из рассматриваемых в табл. 7 сценариев.

Определённые резервы в снижении MESP заключаются в уменьшении дозировки ферментов – как отмечалось выше предполагаемая в моделировании процессов биорефининга дозировка ферментов составляет 20 мг/г. Расчёты показали, что уменьшение дозировки ферментов до 10 мг/г приведёт к значению MESP 1,99 \$/гал этанола при производстве ферментов on site по модификации процесса 1 (табл. 7) и до 1,89 \$/гал этанола при дозировке 5 мг/г. Вклад стоимости ферментов в MESP составит, соответственно 0,18 и 0,08 \$/гал этанола. Отметим, что вклад стоимости ферментов (преимущественно амилаз) при получении биотоплива 1 поколения из зернового сырья составляет 0,02–0,04 \$/гал этанола. Это свидетельствует о наличии резервов для уменьшения стоимости ферментов для получения целлюлозного биоэтанола.

Таблица 7. Влияние различных параметров процесса биоконверсии ВРБ на минимальную цену продажи этанола

	Модификации процесса				
	1	2	3	4	5
Конверсия целлюлозы в глюкозу, %	90	90	90	90	85
Конверсия глюкозы в этанол, %	95	95	95	95	90
Конверсия ксилозы в этанол, %	85	85	40	0	0
Конверсия арабинозы в этанол, %	85	0	0	0	0
Выход этанола, гал/т с.в. стеблей кукурузы	87,08	83,66	70,22	58,31	52,91
Производство этанола, млн гал в год	61	58,6	49,2	40,8	37,1
Производство ферментов on site (вариант 5 Табл. 6)					
Стоимость фермента, \$/гал этанола	0,34	0,35	0,42	0,51	0,56
Стоимость сырья, \$/гал этанола	0,74	0,77	0,92	1,11	1,22
Стоимость процесса конверсии, \$/гал этанола	1,07	1,10	1,27	1,50	1,60
MESP, \$/гал этанола	2,15	2,23	2,61	3,12	3,38
Производство ферментов off site по цене ферментов на рынке Китая (вариант 4 Табл. 6)					
Стоимость фермента, \$/гал этанола	1,66	1,72	2,05	2,47	2,71
Стоимость сырья, \$/гал этанола	0,74	0,77	0,92	1,11	1,22
Стоимость процесса конверсии, \$/гал этанола	1,06	1,11	1,32	1,59	1,76
MESP, \$/гал этанола	3,46	3,60	4,29	5,17	5,69

Соответствующие значения MESP при использовании коммерческих ферментов, произведённых off site по ценам на рынке Китая при дозировках ферментов 10 и 5 мг/г составят 2,63 и 2,21 \$/гал этанола.

Таким образом, способ производства ферментов (on site или off site), дозировка ферментов и выход этанола на единицу массы сырья являются ключевыми факторами, определяющими себестоимость биотоплива 2 поколения. Увеличение эффективности предобработки ВРБ позволит снизить дозировку ферментов до приемлемых 5–10 мг/г, а использование методов метаболической инженерии микроорганизмов, осуществляющих ферментацию гексоз и пентоз в этанол, позволят обеспечить устойчивую рентабельность процессов получения биотоплива 2 поколения.

Х. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ВРБ является практически неисчерпаемым источником энергии и сырья для получения разнообразных коммерчески востребованных продуктов. Этанол (биотопливо 2 поколения) является примером продукта, получение которого из ВРБ осуществлено на практике в виде действующих в разных странах заводов, способных совокупно произвести сотни тысяч тонн продукта в год.

Применяемые в настоящее время подходы для переработки ВРБ в биотопливо 2 поколения заключаются в выборе регионального сырья и метода его предобработки, ферментативном гидролизе полисахаридов до С6 и С5 сахаров, микробиологическом получении из сахаров этанола, его выделения в безводном виде, и утилизации отходов.

На практике в России источником ВРБ могут служить отходы переработки древесины, сельскохозяйственные отходы (солома зерновых культур, свекловичный жом), продукты и отходы целлюлозно-бумажного производства. В Европе, США и Бразилии используют солому, стебли кукурузы, багассу. Большинство видов ВРБ нуждается в предобработке для увеличения РС при ферментативном гидролизе, задачами которой являются удаление лигнина и разрушение кристаллической структуры целлюлозы. Известны разнообразные методы предобработки (механические, физические, физико-химические, биологические), практическое применение нашли только некоторые из них – паровой взрыв, а также гидротермическая обработка – методы, в которых не предусмотрено использование кислот и других химикатов. Для России перспективным методом предобработки может оказаться крафт-варка (сульфатная варка) древесины, применяемая в целлюлозно-бумажном производстве, обеспечивающая существенное

увеличение РС целлюлозы – этот метод детально проработан и позволяет консолидировать процессы биорефайнинга и получения целлюлозы.

Гидролиз ВРБ осуществляется комплексом ферментов, в состав которого в качестве основных входят ЭГ и ЦБГ, а в качестве вспомогательных – БГ и ПМО; кроме целлюлаз в деструкции ВРБ принимают участие гемицеллюлазы (ксилаказы, маннанызы, ксилоглюканазы). Состав комплекса должен быть адаптирован к определённому виду ВРБ и способу предобработки.

Увеличению эффективности процесса гидролиза ВРБ способствует оптимизация условий его проведения – значений pH, температуры, концентрации субстрата, дозировки ферментов, детоксификация ингибиторов, и т.д. Действенным способом является использование методов и подходов белковой инженерии, которые позволяют за счёт внесения мутаций и изменения структуры белковых молекул увеличить каталитическую активность целлюлаз и их операционную стабильность, изменить pH-оптимум, уменьшить степень ингибирования ферментов продуктами реакции.

Важную роль в практической реализации производства биотоплива 2 поколения играет создание штаммов-продуцентов целлюлаз и сопутствующих ферментов, обеспечивающих высокий выход внеклеточного белка. Таковыми являются микроскопические грибы родов *Trichoderma*, *Penicillium*, *Myceliophthora* и некоторые другие. С помощью методов ДНК-технологий из этих штаммов сконструированы рекомбинантные продуценты, позволяющие получать ферментные ансамбли с заданным составом для деструкции разных видов ВРБ; они используются как микроорганизмы-хозяева для высокоэффективной экспрессии генов мутантных ферментов с улучшенными характеристиками. Принципиальным моментом для уменьшения стоимости ферментов является их получение непосредственно на биоэтанольном заводе (on site) вместо выпуска на удалённом специализированном заводе по производству ферментов (off site).

Известны несколько вариантов осуществления процессов биорефайнинга: раздельный / одновременный / гибридный / гидролиз и ферментация, а также консолидированный биопроцесс. На практике при создании коммерческого производства биотоплива 2 поколения получили применение первые два варианта.

В разных странах были построены полномасштабные заводы по производству биотоплива 2 поколения, мощность которых варьирует от 35 до 113 тыс. т 99,5%-ного этанола в год – в Италии (2012 г.) и Бразилии (2014 г.) компаниями Novozymes и Beta Renewables, в 2014–2015 гг. в США компаниями Raizen и Iogen, Abengoa Bioenergy,

Роет – DSM, DuPont. В настоящее время компании Inbicon и Clariant осуществляют (и проектируют) строительство заводов в Европе, США и Китае мощностью до 100 тыс. т этанола.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кряжев А.М. (2020) Наилучшие доступные технологии – основа развития целлюлозно-бумажной промышленности и лесопромышленного комплекса России в XXI веке. 90 с.
2. Аблаев А.Р., Харина М.В. (2017) Тенденции развития производства и использования биотоплив. *Химия биомассы: биотоплива и биопластики* / Ред. С.Д. Варфоломеев. М.: Научный мир, 19–64.
3. (2014) *Bioprocessing of renewable resources to commodity bioproducts. First edition* / Ed. Bisaria, V.S. and Kondo A. John Wiley & Sons, Inc. 584 p.
4. Sticklen, M. (2006) Plant genetic engineering to improve biomass characteristics for biofuels, *Current Opinion in Biotechnology*, **17**, 315–319.
5. BP Statistical Review of World Energy. (2015) Uckfield, UK: Pureprint Group. 46 p.
6. Hogue, C. (2015) Paris climate talks begin, *Chemical & Engineering News, American Chemical Society*, **93**, 21–22.
7. Hansen, J., Sato, M., Ruedy, R., Lo, K., Lea, D., Medina-Elizade, M. (2006) Global temperature change, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103**, 14288–14293.
8. Bowen, E., Kennedy, S.C., Miranda, K. (2010) Ethanol from sugar beets: a process and economic analysis. *A major qualifying project submitted to the faculty of Worcester Polytechnic Institute, in partial fulfillment of the requirements for the degree of bachelor of science*. Worcester. 47 p.
9. The Fifth Assessment Report (AR5) of the United Nations Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC): <https://www.ipcc.ch/report/ar5/wg2/> (2014).
10. Aquila, A., Twardowski, T., Wohlgenuth, R. (2019) Bioeconomy for sustainable development, *Biotechnology journal*, **14**, 1800638.
11. Ragauskas, A.J., Williams, C.K., Davison, B.H., Britovsek, G., Cairney, J., Eckert, C.A., Frederick, W.J., Hallett, J.P., Leak, D.J., Liott, C.L., Mielenz, J.R., Murphy, R., Templer, R., Tschaplinski, T. (2006) The path forward for biofuels and biomaterials, *Science*, **311**, 484–489.
12. Carmen, S. (2009) Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, **27**, 185–194.
13. Menon, V., Rao, M. (2012) Trends in bioconversion of lignocellulose: biofuels, platform chemicals & biorefinery concept, *Progress in Energy and Combustion Science*, **38**, 522–550.
14. Peralta-Yahya P.P., Keasling J.D. (2010) Advanced biofuel production in microbes. *Biotechnology Journal*, **5**, 147–162.
15. Yu-Cai, He, Cui-Luan, Ma, Bin, Yang. (2018) Pretreatment process and its synergistic effects on enzymatic digestion of lignocellulosic materials. *Fungal cellulolytic enzymes. Microbial production and application* / Xu Fang and Yinbo Qu eds. Springer, 2–25.
16. Гусаков А.В., Синицын А.П. (2017) Деполимеризация природных био-

- полимеров. Ферментативный гидролиз целлюлозы, *Химия биомассы: биотоплива и биопластики* / Ред. С.Д. Варфоломеев. М.: Научный мир, 65–99.
17. Gusakov, A.V., Sinitsyn, A.P. (2012) Cellulases from *Penicillium* species for producing fuels from biomass, *Biofuels*, **3**, 463–477.
18. Азаров В.И., Буров А.В., Оболенская А.В. (1999) Химия древесины и синтетических полимеров. СПб.: СПб ЛТА, 628 с.
19. Menon, V., Rao, M. (2012) Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept, *Progress in Energy and Combustion Science*, **38**, 522–550.
20. Новожилов Е.В., Синельников И.Г., Аксенов А.С., Чухчин Д.Г., Тышкунова И.В., Рожкова А.М., Осипов Д.О., Зоров И.Н., Синецын А.П. (2015) Биокаталитическая конверсия сульфатной целлюлозы с применением комплексных биокатализаторов на основе рекомбинантных ферментных препаратов *Penicillium verruculosum*, *Катализ в промышленности*, **15**, 78–83.
21. Nanda, S., Mohammad, J., Reddy, S., Kozinski, J., Dalai, A. (2014) Pathways of lignocellulosic biomass conversion to renewable fuels, *Biomass Conversion and Biorefiner*, **4**, 157–191.
22. Agbor, V.B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A., Levin, D.B. (2011) Biomass pretreatment: Fundamentals toward application, *Biotechnology Advances*, **29**, 675–685.
23. Роговин З.А. (1972) Химия целлюлозы. М.: Химия, 519 с.
24. Doherty, W.O.S., Mousavioun, P., Fellows, C.M. (2011) Value-adding to cellulosic ethanol: Lignin polymers, *Industrial Crops and Products*, **33**, 259–276.
25. Husson, E., Buchoux, S., Avondo, C., Cailleu, D., Djellab, K., Gosselin, I., Wattraint, O., Sarazin, C. (2011) Enzymatic hydrolysis of ionic liquid-pretreated celluloses: Contribution of CP-MAS ¹³C NMR and SEM, *Bioresource Technology*, **102**, 7335–7342.
26. Клесов А.А. (1988) Биотехнология ферментативного превращения целлюлозы. *Итоги науки и техники, Серия Биотехнология*. М.: ВИНТИ, **12**, с. 53–59.
27. Целлюлоза и ее производные / Ред. Байклз И., Сегал Л. (1974) М.: Мир, т. 1 – 500 с., т.2 – 510 с.
28. Sinitsyn, A.P., Gusakov, A.V., Vlasenko, E.Yu. (1991) Effect of structural and physico-chemical features of cellulosic substrates on the efficiency of enzymatic hydrolysis, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **30**, 43–59.
29. Coughlan, M.P., Hazlewood, G.P. (1993) Hemicellulose and hemicellulases. London and Chapel Hill: Portland Press, **4**, 120 p.
30. Vassilev, S.V., Baxter, D., Andersen, L.K., Vassileva, C.G., Morgan, T.J. (2012) An overview of the organic and inorganic phase composition of biomass, *Fuel*, **94**, 1–33.
31. Sanchez, C. (2009) Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, **9**, 185–194.
32. Houfani, A.A., Andersb, N., Spiessb, A.C., Baldrianc, P., Benallaouaa, S. (2020) Insights from enzymatic degradation of cellulose and hemicellulose to fermentable sugars – a review, *Biomass and Bioenergy*, **134**, 105481.
33. Zavyalov, A.V., Rykov, S.V., Lunina, N.A., Sushkova, V.I., Yarotsky, S.V., Berezina, O.V. (2019) Plant polysaccharide xyloglucan and enzymes that hydrolyze it (review), *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, **45**, 845–859.
34. Pauly, M., Albersheim, P., Darvill, A., York, W.S. (1999) Molecular

- domains of the cellulose/xyloglucan network in the cell walls of higher plants. *Plant Journal*, **20**, 629–639.
35. Demartini, J.D., Pattathil, S., Miller, J.S., Li, H., Hahn, M.G., Wyman, C.E. (2013) Investigating plant cell wall components that affect biomass recalcitrance in poplar and switchgrass, *Energy and Environmental Sciences*, **6**, 898–909.
 36. Bomble, Y.J., Lin, C.Y., Amore, A., Wei, H., Holwerda, E.K., Ciesielski, P.N., Donohoe, B.S., Decker, S.R., Lynd, L.R., Himmel, M.E. (2017) Lignocellulose deconstruction in the biosphere, *Current Opinion in Chemical Biology*, **41**, 61–70.
 37. Zeng, Y., Himmel, M.E., Ding, S.-Y. (2017) Visualizing chemical functionality in plant cell walls, *Biotechnology for Biofuels*, **10**, 263.
 38. Peciulyte, A., Kiskis, J., Larsson, P.T., Olsson, L., Enejder, A. (2016) Visualization of structural changes in cellulosic substrates during enzymatic hydrolysis using multimodal nonlinear microscopy, *Cellulose*, **23**, 1521–1536.
 39. McCann, M.C., Carpita, N.C. (2015) Biomass recalcitrance: a multi-scale, multi-factor, and conversion-specific property, *Journal of Experimental Botany*, **66**, 4109–4118.
 40. Nitsos, C.K., Lazaridis, P.A., Mach-Aigner, A., Matis, K.A., Triantafyllidis, K.S. (2019) Enhancing lignocellulosic biomass hydrolysis by hydrothermal pretreatment, extraction of surface lignin, wet milling and production of cellulolytic enzymes, *ChemSusChem*, **12**, 1179–1195.
 41. Donev, E., Gandla, M.L., Jonsson, L.J., Mellerowicz, E.J. (2018) Engineering non-cellulosic polysaccharides of wood for the biorefinery, *Frontiers in Plant Science*, **9**, 1537.
 42. Tarasov, D., Leitch, M., Fatehi, P. (2018) Lignin-carbohydrate complexes: properties, applications, analyses, and methods of extraction: a review, *Biotechnology for Biofuels*, **11**, 269.
 43. Sun, Q., Foston, M., Meng, X., Sawada, D., Pingali, S.V., O'Neill, H.M., Li, H., Wyman, C.E., Langan, P., Ragauskas, A.J., Kumar, R. (2014) Effect of lignin content on changes occurring in poplar cellulose ultrastructure during dilute acid pretreatment, *Biotechnology for Biofuels*, **7**, 150.
 44. Yang, B., Dai, Z., Ding, S.-Y., Wyman, C.E. (2011) Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass, *Biofuels*, **2**, 421–449.
 45. Kumar, P., Barrett, D.M., Delwiche, M.J., Stroevé, P. (2009) Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production, *Industrial and Engineering Chemistry Research*, **48**, 3713–3729.
 46. Karimi, K., Taherzadeh, M.J. (2016) A critical review of analytical methods in pretreatment of lignocelluloses: composition, imaging, and crystallinity, *Bioresource Technology*, **200**, 1008–1018.
 47. Liguori, R., Ventorino, V., Pepe, O., Faraco, V. (2016) Bioreactors for lignocellulose conversion into fermentable sugars for production of high added value products, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **100**, 597–611.
 48. Dibyajyoti, H.M., Kumar, P. (2019) Lignocellulosic conversion into value-added product, *Process Biochemistry*, **89**, 120–150.
 49. Alvira, P., Tomáspejón, E., Ballesteros, M., Negro, M.J., Pandey, A. (2010) Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review, *Bioresource Technology*, **101**, 4851–4861.
 50. Paudel, S.R., Banjara, S.P., Choi, O.K., Park, K.Y., Kim, Y.M., Lee,

- J.W. (2017) Pretreatment of agricultural biomass for anaerobic digestion: current state and challenges, *Biore-source Technology*, **245**, 1194–1205.
51. Hiden, A., Inoue, H., Tsukahara, K., Fujimoto, S., Minowa, T. Inoue, S., Endo, T., Sawayama, S. (2009) Wet disk milling pretreatment without sulfuric acid for enzymatic hydrolysis of rice straw, *Biore-source Technology*, **100**, 2706–2711.
52. Ghizzi, G., Silva, D., Couturier, M., Berrin, J.-G., Buléon, A., Rouau, X. (2012) Effects of grinding processes on enzymatic degradation of wheat straw, *Biore-source Technology*, **103**, 192–210.
53. Liu, H., Pang, B., Zhao, Y., Lu, J., Han, Y., Wang, H. (2018) Comparative study of two different alkali-mechanical pretreatments of corn stover for bioethanol production, *Fuel*, **221**, 21–27.
54. Gu, B.-J., Dhumal, G.S., Wolcott, M.P., Ganjyal G.M. (2019) Disruption of lignocellulosic biomass along the length of the screws with different screw elements in a twinscrew extruder, *Biore-source Technology*, **275**, 266–271.
55. Montiel, C., Hernández-Meléndez, O., Vivaldo-Lima, E., Hernández-Luna, M., Bárzana, E. (2016) Enhanced bioethanol production from blue agave bagasse in a combined extrusion–saccharification process, *Bio-energy Research*, **9**, 1005–1014.
56. Choi, W.I., Ryu, H.J., Kim, S.J., Oh, K.K. (2017) Thermo-mechanical fractionation of yellow poplar sawdust with a low reaction severity using continuous twin screw-driven reactor for high hemicellulosic sugar recovery, *Biore-source Technology*, **241**, 63–69.
57. Yang, C.P., Shen, Z.Q., Yu, G.C., Wang, J.L. (2008) Effect and aftereffect of gamma radiation pretreatment on enzymatic hydrolysis of wheat straw, *Biore-source Technology*, **99**, 6240–6245.
58. Bak, J.S., Ko, J.K., Han, Y.H., Lee, B.C., Choi, I.G., Kim, K.H. (2009) Improved enzymatic hydrolysis yield of rice straw using electron beam irradiation pretreatment, *Biore-source Technology*, **100**, 1285–1290.
59. Ma, H., Liu, W.W., Chen, X., Wu, Y., Yu, Z. (2009) Enhanced enzymatic saccharification of rice straw by microwave pretreatment, *Biore-source Technology*, **100**, 1279–1284.
60. Velmurugan, R., Muthukumar, K. (2011) Utilization of sugarcane bagasse for bioethanol production: sono-assisted acid hydrolysis approach, *Biore-source Technology*, **102**, 7119–7123.
61. Lee, B.-M., Jeun, J.-P., Kang, P.-H. (2017) Enhanced enzymatic hydrolysis of kenaf core using irradiation and dilute acid, *Radiation Physics and Chemistry*, **130**, 216–220.
62. Yin, Y., Wang, J. (2016) Enhancement of enzymatic hydrolysis of wheat straw by gamma irradiation–alkaline pretreatment, *Radiation Physics and Chemistry*, **123**, 63–67.
63. Kapoor, K., Garg, N., Diwan, R.K., Varshney, L., Tyagi, A.K. (2017) Study the effect of gamma radiation pretreatment of sugarcane bagasse on its physico-chemical morphological and structural properties, *Radiation Physics and Chemistry*, **141**, 190–195.
64. Liu, Y., Guo, L., Wang, L., Zhan, W., Zhou, H. (2017) Irradiation pretreatment facilitates the achievement of high total sugars concentration from lignocellulose biomass, *Biore-source Technology*, **232**, 270–277.
65. Singh, R., Krishna, B.B., Kumar, J., Bhaskar, T. (2016) Opportunities for utilization of non-conventional energy sources for biomass pretreatment, *Biore-source Technology*, **199**, 398–407.
66. Kumar, A.K., Sharma, S. (2017) Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review, *Biore-sources and Bioprocess*, **4**, 7.

67. Gogate, P.R., Sutkar, V.S., Pandit, A.B. (2011) Sonochemical reactors: important design and scale up considerations with a special emphasis on heterogeneous systems, *Chemical Engineering Journal*, **166**, 1066–1082.
68. Keshwani, D.R., Cheng, J.J. (2010) Microwave-based alkali pretreatment of switchgrass and coastal bermudagrass for bioethanol production, *Biotechnology Progress*, **26**, 644–652.
69. Teter, S.A., Brandon, S.K., Emme, B. (2014) Enzymatic process and enzyme development in biorefining. *Advances in Biorefineries: Biomass and Waste Supply Chain Exploration* / Ed. Waldron K. Anglia Sci. Written, Ltd. 198–229.
70. Liu, R., Tian, W., Kong, S., Meng, Y., Wang, H., Zhang, J. (2018) Effects of inorganic and organic acid pretreatments on the hydrothermal liquefaction of municipal secondary sludge, *Energy Conversion and Management*, **174**, 661–667.
71. Mishra, A., Ghosh, S. (2019) Bioethanol production from various lignocellulosic feedstocks by a novel «fractional hydrolysis» technique with different inorganic acids and coculture fermentation, *Fuel*, **236**, 544–553.
72. Woiciechowski, A. L., Dalmás, Neto, C.J., Vandenberghe, L.P.S., Carvalho Neto, D.P., Sydney, A.C.N., Letti, L.A.J., Karp, S.G., Torres, L.A.Z., Soccol, C.R. (2020) Lignocellulosic biomass: Acid and alkaline pretreatments and their effects on biomass recalcitrance – Conventional processing and recent advances, *Bioresource Technology*, **304**, 122848.
73. Yu, Z., Du, Y., Shang, X., Zheng, Y., Zhou, J. (2018) Enhancing fermentable sugar yield from cassava residue using a two-step dilute ultra-low acid pretreatment process, *Industrial Crops and Products*, **124**, 555–562.
74. Nitsos, C., Matsakas, L., Triantafyllidis, K., Rova, U., Christakopoulos, P. (2018) Investigation of different pretreatment methods of mediterranean-type ecosystem agricultural residues: characterisation of pretreatment products, high-solids enzymatic hydrolysis and bioethanol production, *Biofuels*, **9**, 545–558.
75. Liu, Q., Li, W., Ma, Q., An, S., Li, M., Jameel, H., Chang, H.M. (2016) Pretreatment of corn stover for sugar production using a two-stage dilute acid followed by wet-milling pretreatment process, *Bioresource Technology*, **211**, 435–442.
76. Rabemanolontsoa, H, Saka, S. (2016) Various pretreatments of lignocellulosics, *Bioresource Technology*, **199**, 83–91.
77. Rattanaporn, K., Roddecha, S., Sriariyanun, M., Cheenkachorn, K. (2017) Improving saccharification of oil palm shell by acetic acid pretreatment for biofuel production, *Energy Procedia*, **141**, 146–149.
78. Jeong, S.-Y., Lee, J.-W. (2016) Optimization of pretreatment condition for ethanol production from oxalic acid pretreated biomass by response surface methodology, *Industrial Crops and Products*, **79**, 1–6.
79. Ostovareh, S., Karimi, K., Zamani, A. (2015) Efficient conversion of sweet sorghum stalks to biogas and ethanol using organosolv pretreatment, *Industrial Crops and Products*, **66**, 170–177.
80. He, Y.C., Liu, F., Di, J.H., Ding, Y., Tao, Z.C., Zhu, Z.Z., Wu, Y.Q., Chen, L., Wang, C., Xue, Y.F., Chong, G.G., Ma, C.L. (2016) Effective enzymatic saccharification of dilute NaOH extraction of chestnut shell pretreated by acidified aqueous ethylene glycol media, *Industrial Crops and Products*, **81**, 129–138.
81. Teramoto, Y., Lee, S.H., Endo, T. (2008) Pretreatment of woody and herbaceous biomass for enzymatic

- saccharification using sulfuric acid-free ethanol cooking, *Bioresource Technology*, **99**, 8856–8863.
82. Arato, C., Kendall, P., Gjennstad, G. (2005) The Lignol approach to biorefining of woody biomass to produce ethanol and chemicals, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **123**, 871–882.
83. Satlewal, A., Agrawal, R., Bhagia, S., Sangoro J., Ragauskas A.J. (2018) Natural deep eutectic solvents for lignocellulosic biomass pretreatment: recent developments, challenges and novel opportunities, *Biotechnology Advances*, **3**, 2032–2050.
84. Zhao, H., Baker, G.A. (2013) Ionic liquids and deep eutectic solvents for biodiesel synthesis: a review, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **88**, 3–12.
85. New, E.K., Wu, T.Y., Lee, C.B., Poon, Z.Y., Loow, Y.-L., Foo, L.Y.W., Procentese, A., Siow, L.F., Teoh, W.H., Daud, N.N., Jahim, J.M., Mohamad, A.W. (2019) Potential use of pure and diluted choline chloride-based deep eutectic solvent in delignification of oil palm fronds, *Process Safety and Environmental Protection*, **123**, 190–198
86. Chen, Z., Jacoby, W.A., Wan, C. (2019) Ternary deep eutectic solvents for effective biomass deconstruction at high solids and low enzyme loadings, *Bioresource Technology*, **279**, 281–286.
87. Chong, G., Di, J., Mab C., Wang, D., Wang, C., Wang, L., Zhang, P., Zhu, J., He, Y. (2018) Enhanced bioreduction synthesis of ethyl (R)-4-chloro-3-hydroxybutanoate by alkaline salt pretreatment, *Bioresource Technology*, **261**, 196–205.
88. Bali, G., Meng, X., Deneff, J.I., Sun, Q., Ragauskas, A.J. (2015) The effect of alkaline pretreatment methods on cellulose structure and accessibility, *ChemSusChem*, **8**, 275–279.
89. Prajapati, B.P., Jana, U.K., Suryawanshi, R.K., Kango, N. (2020) Sugarcane bagasse saccharification using *Aspergillus tubingensis* enzymatic cocktail for 2G bio-ethanol production, *Renewable Energy*, **152**, 653–663.
90. Liu, I., Li, Z. (2017) An electrogenerated base for the alkaline oxidative pretreatment of lignocellulosic biomass to produce bioethanol, *RSC Advances*, **7**, 47456–47463.
91. Bali, G., Meng, X., Deneff, J.I., Sun, Q., Ragauskas A.J. (2015) The effect of alkaline pretreatment methods on cellulose structure and accessibility, *ChemSusChem*, **8**, 275–279.
92. Gong, W., Liu, C., Mu, X., Du, H., Lv, D., Li, B., Han S. (2015) Hydrogen peroxide-assisted sodium carbonate pretreatment for the enhancement of enzymatic saccharification of corn stover, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, **3**, 3477–3485.
93. Qing, Q., Zhou, L.L., Guo, Q., Huang, M.Z., He, Y.C., Wang, L.Q., Zhang, Y. (2016) A combined sodium phosphate and sodium sulfide pretreatment for enhanced enzymatic digestibility and delignification of corn stover, *Bioresource Technology*, **218**, 209–216.
94. Rabemanolontsoa, H., Saka, S. (2016) Various pretreatments of lignocellulosics, *Bioresource Technology*, **199**, 83–91.
95. Sashina, E.S., Kashirskii, D.A., Zaboriski, M., Jankowski, S. (2012) Synthesis and dissolving power of 1-alkyl-3-methylpyridinium-based ionic liquids, *Russian Journal of General Chemistry*, **82**, 1994–1998.
96. Saher, S., Saleem, H., Asim, A.M., Uroos, M., Muhammad, N. (2018) Pyridinium based ionic liquid: a pretreatment solvent and reaction medium for catalytic conversion of cellulose to total reducing sugars (TRS), *Journal of Molecular Liquids*, **272**, 330–336.

97. Trinh, L.T.P., Lee, Y.-J., Park, C.S., Bae, H.-J. (2019) Aqueous acidified ionic liquid pretreatment for bioethanol production and concentration of produced ethanol by pervaporation, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, **69**, 57–65.
98. He, Y.C., Tao, Z.C., Di, J.H., Chen, L., Zhang, L.B., Zhang, D.P., Chong, G.G., Liu, F., Ding, Y., Jiang, C.X., Ma, C.L. (2016) Effective asymmetric bioreduction of ethyl 4-chloro-3-oxobutanoate to ethyl (R)4-chloro-3-hydroxybutanoate by recombinant *E.coli* CCZU-A13 in [Bmim]PF₆-hydrolyzate media, *Bioresource Technology*, **214**, 414–418.
99. Li, Q., He, Y.C., Xian, M., Jun, G., Xu, X., Yang, J.M., Li, L.Z. (2009) Improving enzymatic hydrolysis of wheat straw using ionic liquid 1-ethyl-3-methyl imidazolium diethyl phosphate pretreatment, *Bioresource Technology*, **100**, 3570–3575.
100. Xu, J.X., Xiong, P., He, B.F. (2016) Advances in improving the performance of cellulase in ionic liquids for lignocellulose biorefinery, *Bioresource Technology*, **200**, 961–970.
101. Miranda, R.D.C.M., Neta, J.V., Ferreira, L.F., Gomes, W.A., do Nascimento, C.S., Gomes, E.D.B., Mattedi, S., Soares, C.M.F., Lima, Á.S (2019) Pineapple crown delignification using low-cost ionic liquid based on ethanolamine and organic acids, *Carbohydrate Polymers*, **206**, 302–308.
102. Kanbayashi, T., Miyafuji, H. (2015) Topochemical and morphological characterization of wood cell wall treated with the ionic liquid, 1-ethylpyridinium bromide, *Planta*, **242**, 509–518.
103. Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapfle, M., Ladisch, M. (2005) Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass, *Bioresource Technology*, **96**, 673–686.
104. Putra, Z.A. (2018) Lignocellulosic biomass pretreatment for biorefinery: a review, *Indonesian Journal of Science & Technology*, **3**, 75–81.
105. Verardi, A., Blasi, A., Marino, T., Molino, A., Calabrò, V. (2018) Effect of steam-pretreatment combined with hydrogen peroxide on lignocellulosic agricultural wastes for bioethanol production: analysis of derived sugars and other by-products, *The Journal of Energy Chemistry*, **27**, 535–543.
106. Kataria, R., Mol, A., Schulten, E., Happel, A., Mussatto, S.I. (2017) Bench scale steam explosion pretreatment of acid impregnated elephant grass biomass and its impacts on biomass composition, structure and hydrolysis, *Industrial Crops and Products*, **106**, 48–58.
107. Wang, Z., Wu, G., Jönsson, L.J. (2018) Effects of impregnation of softwood with sulfuric acid and sulfur dioxide on chemical and physical characteristics, enzymatic digestibility, and fermentability, *Bioresource Technology*, **247**, 200–208.
108. Agbor, V.B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A., Levin, D.B. (2011) Biomass pretreatment: fundamentals toward application, *Biotechnology Advances*, **29**, 675–685.
109. Hidayatullah, I.M., Setiadi, T., Kresnowati, M., Boopathy, R. (2020) Xylanase inhibition by the derivatives of lignocellulosic materials, *Bioresource Technology*, **300**, doi: 10.1016/j.biortech.2020.122740
110. Yang, B., Wyman, C.E. (2004) Effect of xylan and lignin removal by batch and flow through pretreatment on the enzymatic digestibility of corn stover cellulose, *Biotechnology and Bioengineering*, **86**, 88–98.

111. Bobleter, O., Concin, R. (1979) Degradation of poplar lignin by hydrothermal treatment, *Cellulose Chemistry and Technology*, **13**, 583–593.
112. Павлов И.Н. (2018) Эффект автогидролитической предварительной обработки мискантуса на реакционную способность к ферментативному гидролизу, *Ползуновский вестник*, **1**, 148–152.
113. Alizadeh, H., Teymouri, F., Gilbert, T.I., Dale, B.E. (2005) Pretreatment of switchgrass by ammonia fiber explosion (AFEX), *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **124**, 1133–1141.
114. Kumar, R., Wyman, C.E. (2009) Does change in accessibility with conversion depend on both the substrate and pretreatment technology?, *Bioresource Technology*, **100**, 4193–4202.
115. Yang, B., Wyman, C.E. (2008) Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol, *Biofuels Bioproducts and Biorefining*, **2**, 26–40.
116. Wyman, C.E., Dale, B.E., Elander, R.T., Holtzapfle, M., Ladisch, M.R., Lee, Y.Y. (2005) Comparative sugar recovery data from laboratory scale application of leading pretreatment technologies to corn stover, *Bioresource Technology*, **96**, 2026–2032.
117. Kim, K., Hong, J. (2001) Supercritical CO₂ pretreatment of lignocellulose enhances enzymatic cellulose hydrolysis, *Bioresource Technology*, **77**, 139–144.
118. Zheng, Y., Lin, H.M., Wen, J., Cao, N., Yu, X., Tsao, G.T. (1995) Supercritical carbon dioxide explosion as a pretreatment for cellulose hydrolysis, *Biotechnology Letters*, **17**, 845–850.
119. Gu, T., Held, M.A., Faik, A. (2013) Supercritical CO₂ and ionic liquids for the pretreatment of lignocellulosic biomass in bioethanol production, *Environmental Technology*, **34**, 1735–1749.
120. Hatakka, A.I., Varesa, T., Lunn, T.K. (1993) Production of multiple lignin peroxidases by the white-rot fungus *Phlebia ochraceofulva*, *Enzyme and Microbial Technology*, **15**, 664–669.
121. Dai, Y., Zhang, H.S., Huan, B., He, Y.C. (2017) Enhancing the enzymatic saccharification of bamboo shoot shell by sequential biological pretreatment with *Galactomyces* sp. CCZU11-1 and deep eutectic solvent extraction, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **40**, 1427–1436.
122. Dai, Y.Z., Si, M.Y., Chen, Y.H., Zhang, N.L., Zhou, M., Liao, Q., Shi, D.Q., Liu, Y.N. (2015) Combination of biological pretreatment with NaOH/Urea pretreatment at cold temperature to enhance enzymatic hydrolysis of rice straw, *Bioresource Technology*, **198**, 725–731.
123. Reeb, C., Phillips, R., Venditti, R., Treasure, T., Daystar, J., Gonzalez, R., Jameel, H., Kelley, S. (2018) Techno-economic analysis of various biochemical conversion platforms for biosugar production: trade-offs of co-producing biopower versus pellets for either a greenfield, repurpose, or co-location siting context, *Bioproducts and Biorefining*, **12**, 390–411.
124. Aksenov, A.S., Tyshkunova, I.V., Poshina, D.N., Guryanova, A.A., Chukhchin, D.G., Sinelnikov, I.G., Terentyev, K.Y., Skorik, Y.A., Novozhilov, E.V., Synitsyn, A.P. (2020) Biocatalysis of industrial kraft pulps: similarities and differences between hardwood and softwood pulps in hydrolysis by enzyme complex of *Penicillium verruculosum*, *Catalysts*, **10**, 536, doi:10.3390/catal10050536.

125. Buzala, K., Przybysz, P., Rosicka-Kaczmarek, J., Kalinowska, H. (2014) Production of glucose-rich enzymatic hydrolysates from cellulosic pulp, *Cellulose*, **22**, 663–674.
126. Доценко Г.С., Чекушина А.В., Кондратьева Е.Г., Правильников А.Г., Андрианов Р.М., Осипов Д.О., Синицына О.А., Короткова О.Г., Степанов В.И., Новожилов Е.В., Ачильдиев Е.Р., Константинова С.А., Синицын А.П. (2012) Реакционная способность различных целлюлозосодержащих материалов при ферментативном гидролизе, *Лесной вестник*, **12**, 129–135.
127. Семёнова М.В., Рожкова А.М., Осипов Д.О., Сатрутдинов А.Д., Синицына О.А., Рубцова Е.А., Кондратьева Е.Г., Синицын А.П. (2019) Подбор оптимального комплекса ферментов для гидролиза углеводов свекловичного жома, *Прикладная биохимия и микробиология*, **55**, 586–593.
128. Синицын А.П., Осипов Д.О., Цурикова Н.В., Великорецкая И.А., Шашков И.А., Зверев С.В. (2016) Возможности использования оболочек белого люпина и сои в биотехнологии, *Биотехнология*, **1**, 27–36.
129. Осипов Д.О., Булахов А.Г., Короткова О.Г., Рожкова А.М., Дуплякин Е.О., Афонин А.В., Серeda А.С., Синицын А.П. (2016) Влияние степени размола пшеничных отрубей на гидратационные свойства и эффективность ферментативного гидролиза, *Катализ в промышленности*, **16**, 75–82.
130. Доценко Г.С., Осипов Д.О., Зоров И.Н., Синицын А.П. (2015) Сравнительный анализ влияния предобработки осиновой древесины водными и водно-органическими растворами серной и азотной кислоты на её реакционную способность при ферментативном гидролизе, *Катализ в промышленности*, **15**, 67–73.
131. Kumar, R., Singh, S., Singh, O.V. (2008) Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives, *The Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **35**, 377–391.
132. Wang, M., Li, Z., Fang, X., Wang, L., Qu, Y. (2012) Cellulolytic enzyme production and enzymatic hydrolysis for second-generation bioethanol production. *Biotechnology in China III: Biofuels and Bioenergy* / Eds. Bai F.-W., Liu C.-G., Huang H., Tsao G.T. Springer, 1–24.
133. Bhattacharya, A.S., Bhattacharya, A., Pletschke, B.I. (2015) Synergism of fungal and bacterial cellulases and hemicellulases: a novel perspective for enhanced bio-ethanol production, *Biotechnology Letters*, **37**, 1117–1129.
134. Lopes, A., Ferreira Filho, E., Moreira, L. (2018) An update on enzymatic cocktails for lignocellulose breakdown, *Journal of Applied Microbiology*, **125**, 632–645.
135. Contreras, F., Pramanik, S., Rozhkova, A.M., Zorov, I.N., Korotkova, O., Sinitsyn, A.P., Schwaneberg, U., Davari, M.D. (2020) Engineering robust cellulases for tailored lignocellulosic degradation cocktails. *International Journal of Molecular Sciences*, **21**, 1589.
136. Davies, G., Henrissat, B. (1995) Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases, *Structure*, **3**, 853–859.
137. Henrissat, B., Davies, G. (1997) Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases, *Current Opinion in Structural Biology*, **7**, 637–644.
138. Sukharnikov, L.O., Cantwell, B.J., Podar, M., Zhulin, I.B. (2011) Cellulases: ambiguous nonhomologous

- enzymes in a genomic perspective, *Trends in Biotechnology*, **29**, 473–479.
139. Shanshan, W., Shufang, W. (2020) Processivity and the mechanisms of processive endoglucanases, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **190**, 448–463.
140. Badino, S.F., Christensen, S.J., Kari, J., Windahl, M.S., Hvidt, S., Borch, K., Westh, P. (2017) Exo-exo synergy between Cel6A and Cel7A from *Hypocrea jecorina*: role of carbohydrate binding module and the endo-lytic character of the enzymes, *Biotechnology and Bioengineering*, **114**, 1639–1647.
141. Westh, P., Borch, K., Sørensen, T., Tokin, R., Kari, J., Badino, S., Cavaleiro, M.A., Røjel, N., Christensen, S., Vesterager, C.S. (2018) Thermoactivation of a cellobiohydrolase, *Biotechnology and Bioengineering*, **115**, 831–838.
142. Hu, G., Heitmann Junior J.A., Rojas, O.J. (2009) Quantification of cellulase activity using the quartz crystal microbalance technique, *Analytical Chemistry*, **81**, 1872–1880.
143. Jeoh, T., Wilson, D.B., Walker, L.P. (2006) Effect of cellulase mole fraction and cellulose recalcitrance on synergism in cellulose hydrolysis and binding, *Biotechnology Progress*, **22**, 270–277.
144. Dotsenko, A., Gusakov, A., Rozhkova, A., Sinitsyna, O., Shashkov, I., Sinitsyn, A. (2018) Enzymatic hydrolysis of cellulosic materials using synthetic mixtures of purified cellulases bioengineered at N-glycosylation sites, *3Biotech*, **8**, 396.
145. Gusakov, A.V., Salanovich, T.N., Antonov, A.I., Ustinov, B.B., Okunev, O.N., Burlingaim, R., Emalfarb, M., Baez, M., Sinitsyn, A.P. (2007) Design of highly efficient cellulase mixture for enzymatic hydrolysis of cellulose, *Biotechnology and Bioengineering*, **97**, 1028–1038.
146. Синицын А.П., Синицына О.А., Зоров И.Н., Рожкова А.М. (2020) Возможности экспрессионной системы гриба *Penicillium verruculosum* для получения продуцентов ферментов, обеспечивающих эффективную деструкцию возобновляемой растительной биомассы (обзор), *Прикладная биохимия и микробиология*, **56**, 1–10.
147. Boisset, C., Pétrequin, C., Chanzy, H., Henriissat, B., Schülein, M. (2001) Optimized mixtures of recombinant *Humicola insolens* cellulases for the biodegradation of crystalline cellulose, *Biotechnology and Bioengineering*, **72**, 339–345.
148. Bajpai, P. (2014) Xylanolytic enzymes. Cambridge: Academic Press, 94 p.
149. Girio, F.M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L.C., Marques, S., Bogel-Lukasik, R. (2010) Hemicelluloses for fuel ethanol: a review, *Bioresource Technology*, **101**, 4775–4800.
150. Polizeli, M.L.T.M., Rizzatti, A.C.S., Monti, R., Terenzi, H.F., Jorge, J.A. (2005) Xylanases from fungi: properties and industrial applications, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **67**, 577–591.
151. Gottschalk, L.M.F., Oliveira, R.A., Bon, E.P.S. (2010) Cellulases, xylanases, β -glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse, *Biochemical Engineering Journal*, **51**, 72–78.
152. Van Dyk, J.S., Pletschke, B.I. (2012) A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes—factors affecting enzymes, conversion and synergy, *Biotechnology Advances*, **30**, 1458–1480.

153. Goncalves, T.A., Damasio, A.R.L., Segato, F., Alvarez, T.M., Bragatto, J., Brenelli, L.B., Citadini, A.P.S., Murakami, M.T., Ruller, R., Paes Leme, A.F., Prade, R.A., Squina, F.M. (2012) Functional characterization and synergic action of fungal xylanase and arabinofuranosidase for production of xylooligosaccharides, *Biore-source Technology*, **119**, 293–299.
154. Moreira, L.R.S., Filho, E.X.F. (2008) An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **79**, 165–178.
155. Mohamad, S.N., Ramanan, R.N., Mohamad, R., Ariff, A.B. (2010) Improved mannan-degrading enzymes' production by *Aspergillus niger* through medium optimization, *New Biotechnology*, **28**, 146–152.
156. Rashmi, R., Siddalingamurthy, K.R. (2018) Microbial xyloglucanases: a comprehensive review, *Biocatalysis and Biotransformation*, **36**, 280–295.
157. Zavyalov, A.V., Rykov, S.V., Lunina, N.A., Sushkova, V.I., Yarotsky, S.V., Berezina, O.V. (2019) Plant polysaccharide xyloglucan and enzyme that hydrolyze it (review), *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, **45**, 845–859.
158. Sinitsyn, A., Korotkova, O., Sinitsyna, O., Rozhkova, A., Dotsenko, G., Proskurina, O., Osipov, D., Kondrat'eva, E., Chekushina, A. (2016) Optimizing the composition of cellulase enzyme complex from *Penicillium verruculosum*: enhancing hydrolytic capabilities via genetic engineering, *Catalysis in Industry*, **8**, 101–106.
159. Синицын А.П., Короткова О.Г., Синицына О.А., Рожкова А.М., Проскурина О.В., Осипов Д.О., Кондратьева Е., Чекушина А.В. (2015) Оптимизация состава целлюлазного ферментного комплекса *Penicillium verruculosum*: увеличение гидролитической способности с помощью методов генетической инженерии, *Катализ в промышленности*, **15**, 78–83.
160. Синицын А.П., Осипов Д.О., Рожкова А.М., Бушина Е.В., Доценко Г.С., Синицына О.А., Кондратьева Е.Г., Немашкалов В.А., Матыс В.Ю., Кошелев А.В., Окунев О.Н. (2013) Получение высокоэффективных ферментных комплексов целлюлаз и гемицеллюлаз для гидролиза растительного сырья на основе штамма *Penicillium verruculosum*, *Биотехнология*, **5**, 50–53.
161. Shen, J., Agblevor, F.A. (2010) Modeling semi-simultaneous saccharification and fermentation of ethanol production from cellulose, *Biomass and Bioenergy*, **34**, 1098–1107.
162. Öhgren, K., Bura, R., Lesnicki, G., Saddler, J.N., Zacchi, G. (2007) A comparison between simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation using steam-pretreated corn stover, *Process Biochemistry*, **42**, 834–839.
163. Morales-Rodriguez, R., Gernaey, K.V., Meyer, A.S., Sin, G. (2011) A mathematical model for simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) of C6 and C5 sugars, *Chinese Journal of Chemical Engineering*, **19**, 185–191.
164. Barati, B., Sadegh Amiri, I. (2015) In Silico Engineering of Disulphide Bonds to Produce Stable Cellulase, *Springer Briefs in Applied Sciences and Technology*, **48**, 86.
165. Yu, H., Huang, H. (2014) Engineering proteins for thermostability through rigidifying flexible sites, *Biotechnology Advances*, **32**, 308–315.
166. Eriksen, D.T., Lian, J., Zhao, H. (2014) Protein design for pathway engineering, *Journal of Structural Biology*, **185**, 234–242.

167. Juturu, V., Wu, J.C. (2014) Microbial cellulases: engineering, production and applications, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **33**, 188–203.
168. Lavinge, J.A., Hill, C.M.D., Tremblay, A., St-Pierre, P., Tomashek, J.J. (2011) Cellulase variants with reduced inhibition by glucose. Patent US 8012734.
169. Atreya, M.E., Strobel, K.L., Clark, D.S. (2016) Alleviating product inhibition in cellulase enzyme Cel7A, *Biotechnology and Bioengineering*, **113**, 330–338.
170. Bashirova, A., Pramanik, S., Volkov, P., Rozhkova, A., Nemashkalov, V., Zorov, I., Gusakov, A., Sinitsyn, A., Schwaneberg, U., Davari, M.D. (2019) Disulfide bond engineering of an endoglucanase from *Penicillium verrucosum* to improve its thermostability, *International Journal of Molecular Sciences*, **20**, 1602.
171. Zhang, Y.-H., Himmel, M.E., Mielenz, J.R. (2006) Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies, *Biotechnology Advances*, **24**, 452–481.
172. Kim, Y.S., Jung, H.C., Pan, J.G. (2000) Bacterial cell surface display of an enzyme library for selective screening of improved cellulase variants, *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 788–793.
173. Murashima, K., Kosugi, A., Doi, R.H. (2002) Thermostabilization of cellulosomal endoglucanase EngB from *Clostridium cellulovorans* by in vitro DNA recombination with non-cellulosomal endoglucanase, *Molecular Microbiology*, **45**, 617–626.
174. Wang, T., Liu, X., Yu, Q., Zhang, X., Qu, Y., Gao, P., Wang, T. (2005) Directed evolution for engineering pH profile of endoglucanase III from *Trichoderma reesei*, *Biomolecular Engineering*, **22**, 89–94.
175. Kaper, T., Brouns, S.J., Geerling, A.C., De Vos, W.M., Van der Oost, J. (2002) DNA family shuffling of hyperthermostable beta-glycosidases, *Biochemical Journal*, **368**, 461–470.
176. Schülein, M. (2000) Protein engineering of cellulases, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1543**, 239–252.
177. Bommarius, A.S., Sohn, M., Kang, Y., Lee, J.H., Realff, M.J. (2014) Protein engineering of cellulases, *Current Opinion in Biotechnology*, **29**, 139–145.
178. Dombkowski, A.A., Sultana, K.Z., Craig, D.B. (2014) Protein disulfide engineering, *FEBS Letters*, **588**, 206–212.
179. Trudeau, D.L., Lee, T.M., Arnold, F.H. (2014) Engineered thermostable fungal cellulases exhibit efficient synergistic cellulose hydrolysis at elevated temperatures, *Biotechnology and Bioengineering*, **111**, 2390–2397.
180. Adney, W.S., Jeoh, T., Beckham, G.T., Chou, Y.-T., Baker, J.O., Michener, W., Brunecky, R., Himmel, M.E. (2009) Probing the role of N-linked glycans in the stability and activity of fungal cellobiohydrolases by mutational analysis, *Cellulose*, **16**, 699–709.
181. Gusakov, A.V., Dotsenko, A.S., Rozhkova, A.M., Sinitsyn, A.P. (2017) N-Linked glycans are an important component of the processive machinery of cellobiohydrolases, *Biochimie*, **132**, 102–108.
182. Dotsenko, A.S., Gusakov, A.V., Volkov, P.V., Rozhkova, A.M., Sinitsyn, A.P. (2016) N-Linked glycosylation of recombinant cellobiohydrolase I (Cel7A) from *Penicillium verrucosum* and its effect on the enzyme activity, *Biotechnology and Bioengineering*, **113**, 283–291.
183. Dotsenko, A.S., Gusakov, A.V., Rozhkova, A.M., Sinitsyna, O.A.,

- Nemashkalov, V.A., Sinitsyn, A.P. (2016) Effect of N-linked glycosylation on the activity and other properties of recombinant endoglucanase IIa (Cel5A) from *Penicillium verruculosum*, *Protein Engineering, Design & Selections*, **29**, 495–501.
184. Martinez, D., Berka, R.M., Henrissat, B., Saloheimo, M., Arvas, M., Baker, S.E., Chapman, J., Chertkov, O., Coutinho, P.M., Cullen, D., Danchin, E.G., Grigoriev, I.V., Harris, P., Jackson, M., Kubicek, C.P., Han, C.S., Ho, I., Larrondo, L.F., De Leon, A.L., Magnuson, J.K., Merino, S., Misra, M., Nelson, B., Putnam, N., Robbertse, B., Salamov, A.A., Schmoll, M., Terry, A., Thayer, N., Westerholm-Parvinen, A., Schoch, C.L., Yao, J., Barabote, R., Nelson, M.A., Detter, C., Bruce, D., Kuske, C.R., Xie, G., Richardson, P., Rokhsar, D.S., Lucas, S.M., Rubin, E.M., Dunn-Coleman, N., Ward, M., Brettin, T.S. (2008) Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus (syn. *Hypocrea jecorina*), *Nature Biotechnology*, **26**, 553–60.
185. Singh, A., Patel, A.K., Adsul, M., Singhanian, R.R. Genetic modification: a tool for enhancement cellulase secretion. (2017) *Biofuel Research Journal*, **14**, 600–610.
186. Gusakov, A.V. (2011) Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production, *Trends Biotechnology*, **29**, 419–425.
187. Марков А.В., Гусаков А.В., Кондратьева Е.Г., Окунев О.Н., Беккаревич А.О., Синицын А.П. (2005) Новый эффективный метод анализа компонентного состава ферментных комплексов *Trichoderma reesei*, *Биохимия*, **70**, 796–804.
188. Булахов А.Г., Гусаков А.В., Чекушина А.В., Сатрутдинов А.Д., Кошелев А.В., Матыс В.Ю., Синицын А.П. (2016) Получение гомогенных полисахариднооксигеназ и изучение их синергизма с целлюлазами при действии на целлюлозу, *Биохимия*, **81**, 702–711.
189. Merino, S. T., Cherry, J. (2007) Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization, *Biofuels*, **108**, 95–120.
190. Чекушина А.В., Доценко Г.С., Кондратьева Е.Г., Синицын А.П. (2013) Компонентный состав коммерческих ферментных препаратов, полученных с помощью грибов рода *Trichoderma* и предназначенных для биоконверсии растительного сырья, *Биотехнология*, **3**, 58–68.
191. National Renewable Energy Laboratory (NREL): <http://www.nrel.gov/>.
192. Berlin, A., Gilkes, L., Kilburn, D., Maximenko, V., Bura, R., Markov, A., Skomarowsky, A., Gusakov, A., Sinitayn, A., Okunev, O., Solovieva, I., Saddaler, J. (2006) Evaluation of cellulase preparations for hydrolysis of redwood substrates, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **129–132**, 528–545.
193. Morozova, V.V., Gusakov, A.V., Andrianov, R.M., Pravilnikov, A.G., Osipov, D.O., Sinitsyn, A.P. (2010) Cellulase complex of the fungus *Penicillium verruculosum*: properties of major endoglucanases and cellobiohydrolases, *Biotechnology Journal*, **5**, 871–880.
194. Qin, Y., Liu, G., Li, Z. (2018) Development of highly efficient, low-cost lignocellulolytic enzyme systems in a *Penicillium*: from strain screening to systems biology. *Fungal cellulolytic enzymes. Microbial production and application.* / Eds. Fang, X., Qu, Y. Singapore: Springer Nature Pte Ltd., 61–80.
195. Синицын А.П., Окунев О.Н., Черноглазов В.М., Синицына

- О.А., Попов В.О. (2009) Штамм мицелиального гриба *Penicillium verruculosum* – продуцент комплекса целлюлаз, ксиланазы и ксилоглюканазы и способ получения ферментного препарата комплекса целлюлаз, ксиланазы и ксилоглюканазы для гидролиза целлюлозы и гемицеллюлозы. Патент РФ 2361918.
196. Сеницын А.П., Короткова О.Г., Рубцова Е.А., Сеницына О.А., Кондратьева Е.Г., Середа А.С., Зоров И.Н., Рожкова А.М. (2019) Конструирование рекомбинантных продуцентов ферментных препаратов для кормопроизводства с помощью экспрессионной системы на основе гриба *Penicillium verruculosum*, *Биотехнология*, **36**, 6–14.
197. Olson, D.G., McBride, J.E., Joe Shaw, A., Lynd, L.R. (2012) Recent progress in consolidated bioprocessing, *Current Opinion in Biotechnology*, **23**, 396–405.
198. Сорокина К.Н., Самойлова Ю.В., Пилигаев А.В., Шивакумар У., Пармон В.Н. (2017) Новые методы одностадийной переработки лигноцеллюлозной биомассы в ценные продукты. Часть 2. Подходы, применяемые в биотехнологической переработке поли- и моносахаридов в ценные продукты, востребованные химической промышленностью, *Катализ в промышленности*, **1**, 70–77.
199. Antonov, L., Schlembach, I., Regestein, L., Rosenbaum, M.A., Büchs, J. (2017) Process relevant screening of cellulolytic organisms for consolidated bioprocessing, *Biotechnology for Biofuels*, **10**, 106–120.
200. Gusakov, A.V. (2013) Cellulases and hemicellulases in the 21st century race for cellulosic ethanol, *Biofuels*, **4**, 1–3.
201. Beta Renewables. World's first commercial scale cellulosic ethanol plant uses Proesa® process: www.betarenewables.com.
202. <http://www.betarenewables.com/proesa/biorefinery>.
203. GranBio cellulosic ethanol production project, Alagoas: <https://www.chemicals-technology.com/projects/graalbio-cellulosic-ethanol-project-brazil>.
204. Abengoa bioethanol plant: <http://www.chemicals-technology.com/projects/abengoa-bioethanol-plant/>.
205. <http://biofuels.dupont.com/cellulosic-ethanol/nevada-site-ce-facility/>.
206. Poet-DSM makes major technology process purchase for commercial cellulosic bio-ethanol: <http://poet.com/pr/poet-dsm-makes-major-technology-process-purchase-for-cellulosic-bio-ethanol/>.
207. Cellulosic production idled: <https://www.dtnpf.com/agriculture/web/ag/news/business-inputs/article/2019/11/19/citing-epa-decisions-poet-dsm-plant/>.
208. Kalundborg bioethanol demonstration plant: https://www.chemicals-technology.com/projects/kalundborg_bioethanol/.
209. Clariant specialty chemicals: <https://www.clariant.com/>.
210. Китайцы перерабатывают сельхозотходы в этанол по технологии Clariant: <http://biotoplivo.ru/news/2239/>.
211. Liu, G., Zhang, J., Bao, J. (2016) Cost evaluation of cellulase enzyme for industrial-scale cellulosic ethanol production based on rigorous Aspen Plus modeling, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **39**, 133–140.
212. https://ru.globalpetrolprices.com/ethanol_prices.

-
213. Klein-Marcuschamer, D., Oleskiewicz-Popiel, P., Simmons, B.A., Blanch, H.W. (2012) The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels. *Biotechnology and Bioengineering*, **109**, 1083–1087.
214. Kazi, F.K., Fortman, J., Anex, R., Kothandaraman, G., Hsu, D., Aden, A., Dutta, A. (2010) Techno-economic analysis of biochemical scenarios for production of cellulosic ethanol, *National Renewable Energy Laboratory*, doi: 10.2172/982937.