

Казанский Федеральный Университет
Кафедра высоковязких нефтей и природных битумов
Kazan Federal University,
Department of high-viscosity oils and natural bitumen
Российское газовое общество
Russian Gas Society

**Характеристика существующих технологий производства биоэтанола из
лигноцеллюлозного сырья**

**Characteristics of existing technologies for the production of bioethanol from
lignocellulose raw materials**

Джамалов Зохид Зафарович, Djamalov Zohid Zafarovich

Кемалов Руслан Алимович, Kemalov Ruslan Alimovich

Кемалов Алим Фейзрахманович, Kemalov Alim Feizrahmanovich

аспирант кафедры высоковязких нефтей и природных битумов
кандидат технических наук, доцент кафедры высоковязких нефтей и природных битумов,
Член Экспертного совета РГО, и.о. руководителя группы «Водородная и альтернативная,
доктор технических наук, профессор, заведующий кафедрой высоковязких нефтей и
природных битумов
Казань, Россия

E-mail: z.djamalov@mail.ru, kemalov@mail.ru

Аннотация: Использование непищевых отходов сельского хозяйства (кукурузные кочерыжки, солома, шелуха семян подсолнечника, жом сахарного тростника) и деревоперерабатывающей промышленности (опилки, щепы), позволяет снизить конечную стоимость биоэтанола и обеспечивает более полное вовлечение растительной биомассы в технологический процесс, решая экологическую проблему утилизации отходов, кроме этого позволяет избежать конкуренции с пищевой промышленностью. Выделяют четыре основные технологии производства этилового спирта: SHF (*separate hydrolysis and fermentation* – разделенный гидролиз и ферментация), SSF (*simultaneous saccharification and fermentation* – одновременное осахаривание и ферментация), SSCF (одновременное осахаривание и со-ферментация) и CBP (*consolidate bioprocessing* – консолидированная биопереработка)

Ключевые слова: целлюлоза, лигнин, биоэтанол, биотоплива, лигноцеллюлоза, гемицеллюлоза, полимер, спирт, предобработки, базидиомицет, грибы, ферменты.

Abstract: The use of non-food waste from agriculture (corn stalks, straw, sunflower seed husks, sugar cane pulp) and the wood processing industry (sawdust,

wood chips), reduces the final cost of bioethanol and ensures more complete involvement of plant biomass in the technological process, solving the environmental problem of waste disposal, in addition, avoids competition with the food industry, There are four main technologies for the production of ethyl alcohol: SHF (separate hydrolysis and fermentation – separated hydrolysis and fermentation), SSF (simultaneous saccharification and fermentation - simultaneous saccharification and fermentation), SSCF (simultaneous saccharification and co-fermentation) and CBP (consolidated bioprocessing - consolidated bio-processing)

Keywords: cellulose, lignin, bioethanol, biofuels, lignocellulose, hemicellulose, polymer, alcohol, pretreatments, basidiomycetes, fungi, enzymes.

Введение (Introduction)

Характеристика лигноцеллюлозного сырья - Лигноцеллюлоза является дешевым, доступным и возобновляемым сырьем для производства высокоэнергетических биотоплив, одним из которых является биоэтанол. Преимуществом использования лигноцеллюлозных субстратов является избегание конкуренции с пищевой промышленностью и решение важной экологической проблемы – утилизация отходов деревообрабатывающей, сельскохозяйственной и других отраслей промышленности [1, 2]. Кроме, этого, для производства 1 тонны биоэтанола требуется гораздо меньше сырья, наряду с пищевым растительным сырьём (рисунок 1) [3].

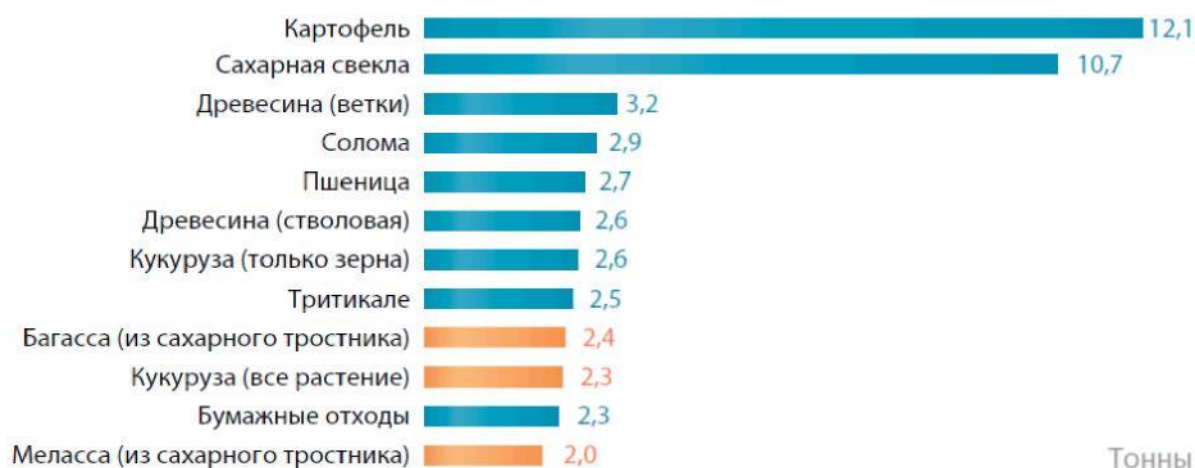


Рисунок 1 – Расход природного сырья на производство 1 тонны биоэтанола

Лигноцеллюлозная биомасса состоит, преимущественно, из целлюлозы (30-50%), гемицеллюлоз (15-35%) и лигнина (10-20%), в меньших количествах также содержит пектин, белки, экстрактивные вещества и золу [4, 5].

Целлюлоза – наиболее распространенное в природе органическое соединение. Она является основным структурным компонентом растительной клеточной стенки и представляет собой линейный полисахарид со степенью полимеризации до 10000 единиц, мономерами которого являются остатки D-глюкозы, связанные между собой β -1,4-гликозидными связями. [6, 7]. На рисунке 2 приведен фрагмент молекулы целлюлозы.

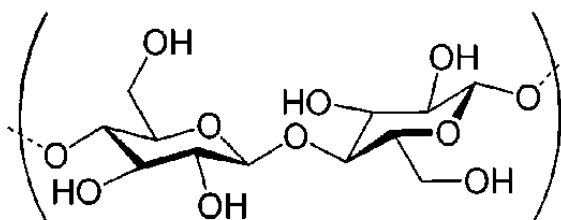


Рисунок 2 – Фрагмент молекулы целлюлозы

Полимерные цепи целлюлозы закручены водородными связями в так называемые микрофибриллы, которые помещены в матрикс из гемицеллюлоз и лигнина [8].

Гемицеллюлозы - комплекс полисахаридов со степенью полимеризации до 200 единиц, мономерами которых являются, в основном, D-глюкоза, D-манноза, D-ксилоза, L-арабиноза, D-галактозой, D-глюкуроновая кислота и 4-O-метил-D-глюкуроновая кислота [5, 9, 10]. Структурные компоненты гемицеллюлозы представлены на рисунке 3. Полимерные цепи гемицеллюлоз могут быть сшиты поперечными связями с лигнином [11]. Будучи не ковалентно связанными с целлюлозой, гемицеллюлозы создают эффективную оболочку для защиты целлюлозных волокон и укрепляют лигноцеллюлозные клеточные стенки растений. Гемицеллюлозы легче подвергаются гидролизу по сравнению с целлюлозой благодаря разветвленной аморфной структуре [12].

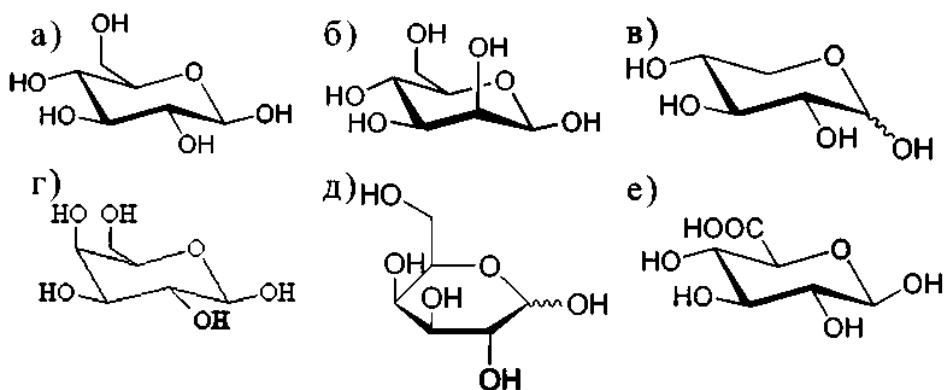


Рисунок 3 – Структурные компоненты гемицеллюлозы:

а) D-глюкоза; б) D-манноза; в) D-ксилоза; г) L-арабиноза; д) D-галактоза; е) D-глюконовая кислота

Лигнин является природным гетеро полимером, который осуществляет естественную защиту целлюлозы и гемицеллюлозы от химического и биологического воздействия [13]. Является вторым по распространенности компонентом лигноцеллюлозного сырья, его содержание в древесине колеблется от 15 до 30%. Лигнин крайне устойчив к химическим воздействиям [9]. Точное строение макромолекулы лигнина изучено недостаточно; кроме этого лигнины, получаемые из разных растений, значительно отличаются друг от друга по химическому составу. Элементарными звеньями в макромолекулах лигнина являются фенилпропановые структурные единицы С₆-С₃ [14]. Предполагаемое строение лигнина приведено на рисунке 4.

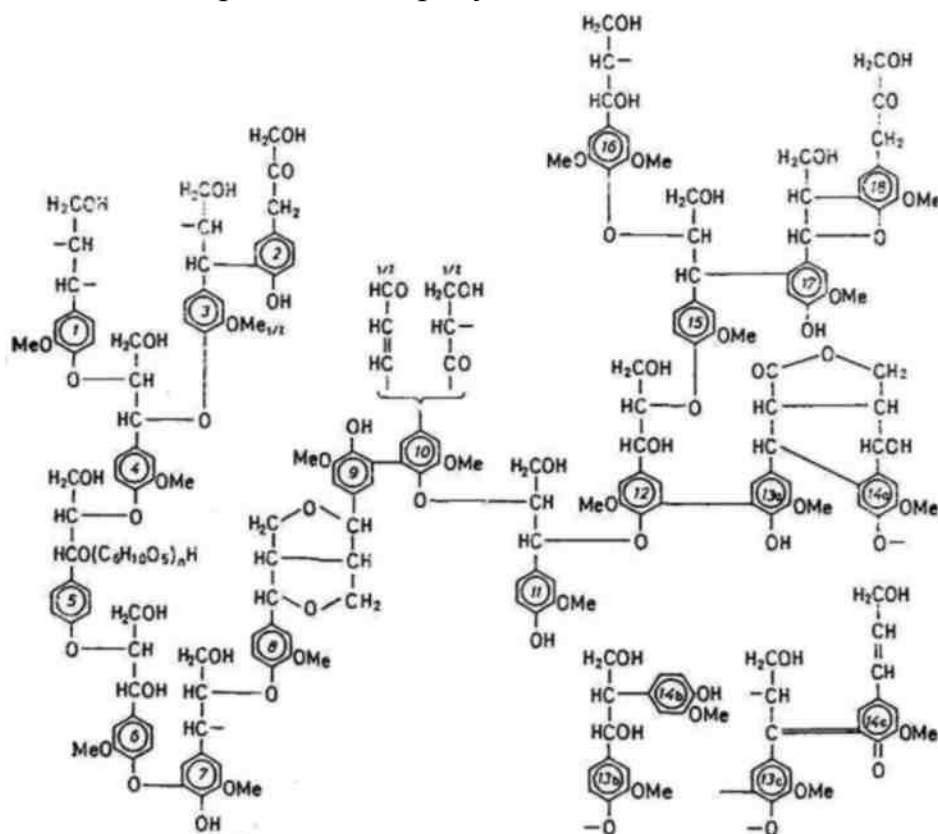


Рисунок 4 – Предполагаемая структура лигнина [15]

Разветвленные молекулы лигнина построены, главным образом, из остатков замещенных фенолоспиртов: 3-метоксигидроксикоричного, или кониферилового, 3,5-диметокси-4-гидроксикоричного, или синапового и п-гидроксикоричного, или п-кумарового. Структурные формулы спиртов приведены на рисунке 5.

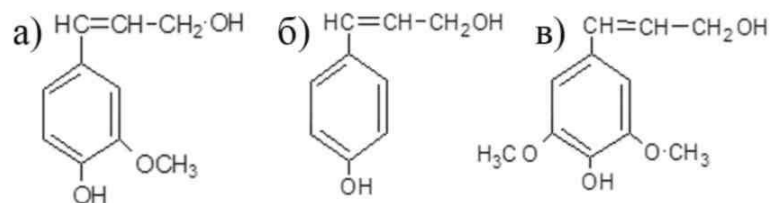


Рисунок 5 – Структурные формулы остатков спиртов, входящих в состав молекулы лигнина: а) кониферилловый спирт; б) кумаровый спирт; в) синаповый спирт

Лигнин, содержащийся в древесине хвойных пород деревьев, включает в свою структуру, в основном, остатки кониферилового спирта, лигнин лиственных пород деревьев – остатки синапового и кониферилового спиртов, травянистых растений и некоторых родов деревьев (например, *Populus*) – остатки кумарового спирта. Лигнин обладает биологической активностью и проявляет пластические свойства при повышенном давлении и температуре, особенно во влажном состоянии.

Несмотря на доступность и низкую стоимость, использование лигноцеллюлозы для получения целевых продуктов затрудняется необходимостью ее предобработки с целью удаления лигнина. Кроме этого, стоит обратить внимание на то, что различные по структуре сахара (пентозы и гексозы), образующиеся в результате гидролиза целлюлоз и гемицеллюлоз, требуют различных ферментов для их гидролиза.

Основными продуктами, получаемыми из лигноцеллюлозных субстратов, в настоящее время являются биоэтанол, биобутанол, γ -валеролактон, фурфурол, гидроксиметилфурфурол и др.

Характеристика базидиальных грибов - Базидиальные грибы, или Базидиомицеты (лат. Basidiomycota) – отдел царства грибов, насчитывающий порядка 30 000 видов, главным признаком видов которого служит образование спор в специализированных структурах – базидиях [16]. Второстепенным признаком, характерным для большинства базидиальных грибов, является наличие на гифах мицелия специализированных структур – пряжек [17].

Вегетативное тело базидиальных грибов представлено септированным мицелием, состоящим из нитевидных образований – гиф, для некоторых видов характерен дрожжеподобный рост. Клеточная стенка грибов многослойная и электропроницаемая, состоит из хитина и глюканов, у некоторых видов, имеющих дрожжеподобную стадию, в структуре присутствуют маннаны. Септы (перегородки) в гифах – долипоровые [18, 19].

Вегетативное размножение происходит фрагментацией таллома, бесполое размножение (анаморфа) не выражено (за исключением ржавчинных грибов). Половое размножение (телеоморфа) осуществляется в две стадии: половой процесс (соматогамия) и образование плодового тела (базидиомы) с базидиями. Соматогамия осуществляется путем слияния двух вегетативных клеток гаплоидного мицелия, прорастающего из базидиоспор. При этом происходит слияние цитоплазмы, а ядра объединяются в пары, называемые дикарионами, которые после этого синхронно делятся. У многих видов базидиальных грибов дикариотичный мицелий имеет особые клетки – пряжки, находящиеся у поперечных перегородок клеток мицелия. Пряжка восстанавливает двуядерность клетки, от которой отделилась материнская клетка базидии [16, 18, 20].

Базидиальные грибы, относятся к различным экологическим группам, но, в основном, это сапрофиты, ксилотрофы, то есть, они используют для роста и развития растительный материал: древесину и древесные остатки. Природная деструкция растительных остатков грибами осуществляется с помощью комплекса внеклеточных ферментов: лигниназ и целлюлаз. Особенности строения растительного субстрата определяют состав и свойства ферментного комплекса гриба-деструктора. В связи с этим базидиальные грибы делят на две условные группы: грибы бурой гнили и грибы белой гнили. К грибам бурой или деструктивной гнили относят грибы, утилизирующие, преимущественно, целлюлозу, деструкция осуществляется за счет выделения целлюлаз: эндоглюканаз, целлобиогидралаз и β -глюкозидаз. Древесина теряет прочность и рассыпается на отдельные кубики. Примерами могут служить грибы *Fomitopsis pinicola*, *Irpex lacteus*, *Sporotrichum pulverulentum*, *Stereum sanguinoleum* и др. Среди грибов бурой гнили также хорошо изучены грибы родов *Antrodia* и *Gloeophyllum*. К грибам белой или коррозионной гнили относят организмы, деструктирующие субстраты с высоким содержанием фенолпропанового полимера – лигнина. Ферментный комплекс этих грибов включает лигнинпероксидазу, Mn-пероксидазу, лакказу и др. Древесина при этом расщепляется на отдельные волокна белого цвета. Представителями являются: *Pleurotus ostreatus*, *Fomes fomentarius*, *Peniophora gigantea*, виды рода *Coriolus* (*Trametes*) и др. [18, 21, 22].

Механизм действия целлюлаз базидиальных грибов - Ферментативная деструкция целлюлозы происходит под действием комплекса целлюлаз, собранных в полиферментные системы, состоящие из экзо- и эндоферментов. Совместное функционирование этих ферментов позволяет с максимальной

эффективностью превращать целлюлозу в мономерные единицы, которые затем служат основой для синтеза новых химических веществ, необходимых для нормальной жизнедеятельности микроорганизмов [15, 23, 24]. Целлюлазы относятся к классу карбогидролаз (О-гликозид-гидролаз, КФ 3.2.1) и включают комплекс ферментов, к которым в соответствии с номенклатурой и классификацией ферментов следует отнести следующие:

- 1) 1,4- β -D-глюкан-глюканогидролаза (КФ 3.2.1.4) – эндоглюканаза, способная неупорядоченно гидролизовать в целлюлозе и других β -глюканах β -1-4-связи; помимо целлоолигосахаридов могут образовываться глюкоза и целлотриозы;
- 2) 1,4- β -D-глюкан-глюкогидролаза (КФ 3.2.1.74) – экзо-1,4- β -глюкозидаза, гидролизующая 1,4-связи в 1,4- β -D-глюканах с последовательным отщеплением глюкозных остатков;
- 3) 1,4- β -D-глюкан-целлобиогидролаза (КФ 3.2.1.91) – целлобиогидролаза, отщепляющая целлобиозу с не редуцирующих концов целлоолигосахаридов;
- 4) β -D-гликозид-глюкогидролаза (КФ 3.2.1.21) – β -глюкозидаза, или целлобиаза, отщепляющая гидролитически концевые нередуцирующие остатки β -D-глюкозы; может гидролизовать β -D-гликозиды и целлобиозу [7].

Учитывая то, что молекула природной целлюлозы состоит из нескольких тысяч остатков глюкозы, являющихся мономерами полимерной цепи, и количество концевых глюкозных остатков для действия экзоферментов в исходном полимере мало, сначала в процесс деградации целлюлозы вовлекаются эндоглюканазы. Каждая удачная атака фермента эндоглюканазы приводит к разрыву полимерной целлюлозной цепи и образованию двух новых концевых молекул целлюлозы, которые, в свою очередь, также могут быть атакованы экзоферментами. То есть, значение экзоферментов и скорость их действия возрастают при повышении степени деградации целлюлозы эндоферментами. Образующиеся в процессе разрыва полимерной цепочки целлобиоза и целлотриоза расщепляются до двух и трех молекул глюкозы, соответственно под действием β -глюкозидазы [25]. Обычно в лабораторных условиях микроорганизмы синтезируют эти ферменты только тогда, когда целлюлоза – единственный доступный субстрат. Их синтез подавляют не только другие субстраты, но и целлобиоза – продукт расщепления целлюлозы [25, 26]. Это связано с существованием двух, действующих по принципу обратной связи, регуляторных механизмов: активно накапливающаяся целлобиоза ингибирует гидролиз целлюлозы, а образующаяся глюкоза

препятствует гидролизу целлобиозы. В подтверждение этого было показано, что 0,01%-ный раствор целлобиозы ингибирует активность целлюлазы на 75% [26].

Подробный механизм деструкции целлюлозы до глюкозы представлен на рисунке 6.

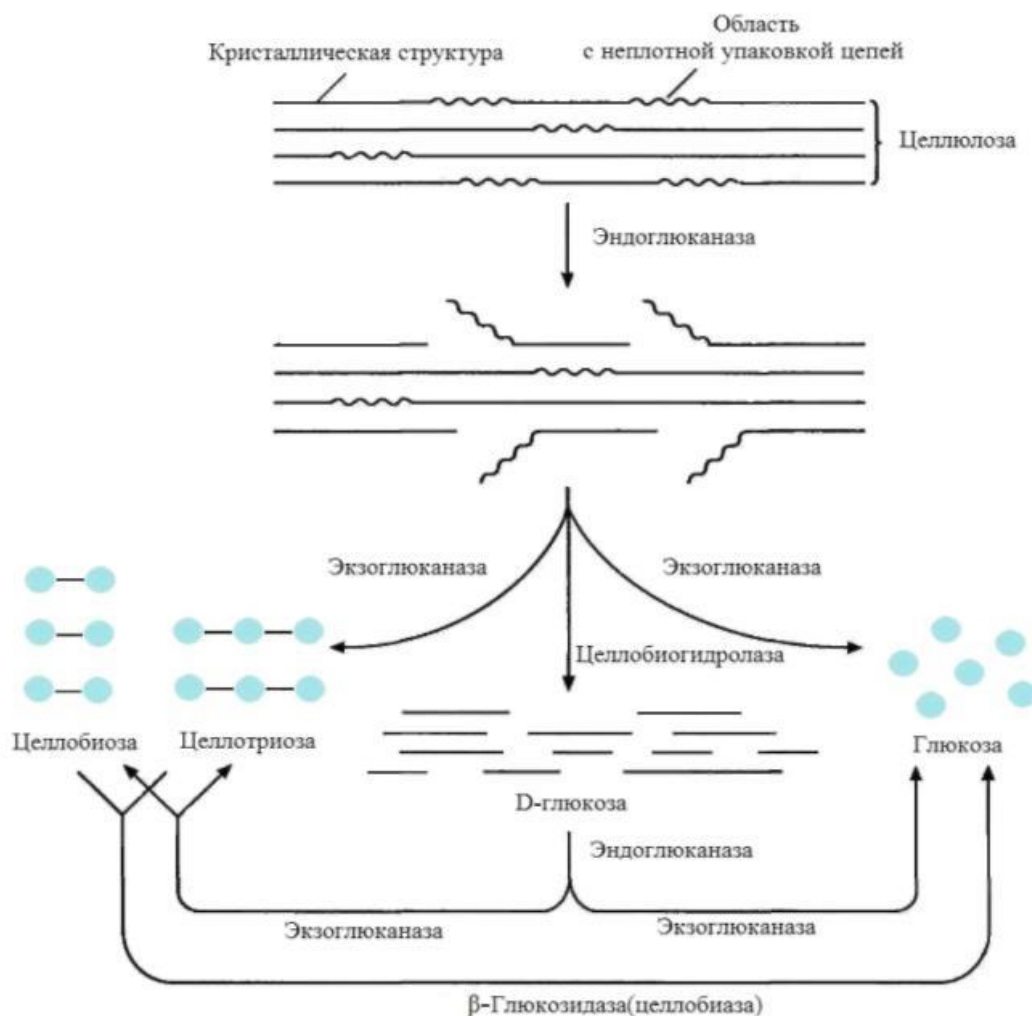


Рисунок 6 – Схема ферментативного гидролиза целлюлозы

Еще одним важным ферментным комплексом базидиальных грибов являются гемицеллюлазы, гидролизующие гемицеллюлозы, высокомолекулярные полисахариды, растворимые в щелочных растворах и являющиеся одним из компонентов соломы, древесины, оболочек семян и плодов и других одревесневших растительных субстратов. При ферментативном гидролизе гемицеллюлоз образуется смесь сахаров: маннозы, галактозы, арабинозы, ксилозы [7].

Механизм действия лигнин разрушающих ферментов

Система лигнин разрушающих ферментов (или лигниназ) базидиальных грибов представлена достаточно широким спектром ферментов, которые разделяют на две группы: фенол оксидазы, к которым относят лакказы и гемсодержащие пероксидазы (Mn-пероксидаза, лигнинпероксидаза, полифункциональная пероксидаза и др.) [33, 27, 28]. Разрушение лигнина происходит по окислительному механизму с обязательным участием активного кислорода. Грибы бурой гнили изменяют лигнин лишь химически, понижая количество метоксильных групп и повышая содержание карбоксильных и карбонильных групп с помощью реакций деметилирования и окислительной деструкции. Окисление приводит к потерей углерода пропановых цепей и метоксильных групп с образованием CO₂, при этом введение кислорода может компенсировать потерю массы [29]. Несмотря на то, что лигнин разрушающие ферменты продуцируются грибами независимо от наличия лигнина, то есть являются неспецифичными по субстрату (в отличие от целлюлаз), в ряде исследований отмечено, что в ответ на недостаток в среде азота, углерода или серы проявляется лигнолитическая активность [30, 31].

В общем виде деструкция лигнина идет через следующие стадии [32]:

- 1) окисление боковых цепей лигнина по α - и β -углеродным атомам и образование структур, содержащих кетогруппы, а также фенольных структур;
- 2) гидролитическое расщепление β -O-4 эфирных связей и образование фенольных и спиртовых структур;
- 3) разрушение алкил-арильных C-C связей с образованием п-хиноидных структур и кислотных или альдегидных фрагментов;
- 4) гидроксילирование и деметилирование ароматического кольца;
- 5) расщепление ароматического кольца и накопление алифатических продуктов, например, карбоновых кислот.

Кроме вышеперечисленных, для базидиальных грибов существует третий путь деструкции лигноцеллюлозного субстрата - не ферментативный. В основе его механизмов лежат радикальные процессы с участием ионов металлов переменных валентностей [33].

Характеристика существующих технологий производства биоэтанола из лигноцеллюлозного сырья

Биоэтанол является одним из наиболее распространенных альтернативных топлив наряду с биодизельным топливом, биогазом [34].

Сырьем для производства биоэтанола являются сахар и крахмал, получаемые из сельскохозяйственных культур: сахарного тростника, сахарной свеклы, пшеницы, кукурузы и др. В связи с растущим спросом на биотоплива возникает конкуренция с производством продуктов питания [35]. Использование непищевых отходов сельского хозяйства (кукурузные кочерыжки, солома, шелуха семян подсолнечника, жом сахарного тростника) и деревоперерабатывающей промышленности (опилки, щепа), позволяет снизить конечную стоимость биоэтанола и обеспечивает более полное вовлечение растительной биомассы в технологический процесс, решая экологическую проблему утилизации отходов, кроме этого позволяет избежать конкуренции с пищевой промышленностью [36].

Выделяют четыре основные технологии производства этилового спирта: SHF (*separate hydrolysis and fermentation* – разделенный гидролиз и ферментация), SSF (*simultaneous saccharification and fermentation* – одновременное осахаривание и ферментация), SSCF (одновременное осахаривание и со-ферментация) и CBP (*consolidate bioprocessing* – консолидированная биопереработка) [37, 38].

Все эти технологии включают стадию обязательной предобработки для удаления лигнина и основаны на процессах ферментативного гидролиза целлюлозы и гемицеллюлоз до моносахаров и сбраживания полученных гидролизатов, которые можно осуществлять, как последовательно, так и одновременно [39, 40]. Наиболее часто используют ферментные препараты из таких грибов, как *Trichoderma viride*, *Trichoderma reesei* и *Fusarium solani* [41]. В качестве организма, сбраживающего сахара, используют аскомицентные дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*.

SHF-технология предполагает, что ферментативный гидролиз и процессы брожения протекают в двух различных реакторах. Для каждого из процессов подбираются оптимальные условия, в частности, pH и температура. Однако накапливающиеся в стадию ферментативного гидролиза глюкоза и целлобиоза ингибируют активность целлюлаз.

SSF-технология предполагает проведение ферментативного гидролиза и брожения в реакторе сосуде, таким образом, глюкоза, являющаяся продуктом ферментативного гидролиза, преобразуется в этанол. Накопление этанола в среде позволяет избежать контаминации культуральной жидкости патогенной микрофлорой. На рисунке 7 приведена принципиальная схема получения биоэтанола из лигноцеллюлозного сырья по технологии SSF.

Технология SSF является более перспективной по сравнению с SHF, так как позволяет избежать ингибирования ферментов продуктами гидролиза – целлобиозой и глюкозой и тем самым повысить выход целевого продукта [42, 43].

SSCF-технология осуществляется путем объединения ферментативного гидролиза целлюлозы до глюкозы и совместного брожения пентоз и гексоз в одном реакторе [44, 45]. Принципиальная схема SSCF-технологии приведена на рисунке 8. Объединение процессов позволяет сократить число реакторов в технологической схеме.



Рисунок 7 – Принципиальная схема SSF-технологии получения биоэтанола из лигноцеллюлозного сырья [36].



Рисунок 8 – Принципиальная схема SSCF-технологии получения биоэтанола из лигноцеллюлозного сырья [46]

СВР-технология заключается в использовании живых организмов на всех стадиях производства биоэтанола из лигноцеллюлозного сырья, что приводит к

сокращению числа стадий процесса и прямой конверсии сырья в целевые продукты (рисунок 9).



Рисунок 9 – Принципиальная схема СВР-технологии получения биоэтанола из лигноцеллюлозного сырья [46]

В последние несколько лет проводятся исследования бактерий, обладающих способностью превращать лигноцеллюлозное сырье в этанол. Так, показано, что бактерия *Clostridium phytofermentans* может быть использована для утилизации кукурузной соломы с выходом до 2,8 г/л биоэтанола, кроме этого показана возможность использования данной бактерии для утилизации глюканов и ксилана с выходом до 7 г/л этанола за 11 суток культивирования [38, 47]. Еще одним из организмов, способных сбраживать целлобиозу, просо и микрокристаллическую целлюлозу марки Avicel, является термофильная генетически модифицированная бактерия *Caldicellulosiruptor bescii* [48, 49]. В генетический аппарат бактерии был внедрен ген другой бактерии *Clostridium thermocellum*, и удалено два гена, отвечающих за утилизацию продуктов брожения. Бактерия ферментирует до 30% биомассы, а выход составляет до 1,7 моль этанола с одного моля глюкозы, что близко к теоретическому максимуму. Недостатком использования данной бактерии является высокая температура процесса: 65-75 °С.

СВР-технология является наиболее перспективной, так как использование живых организмов на всех стадиях производства позволяет снизить стоимость затрат, исключая необходимость использования дорогостоящего оборудования и реагентов.

Главным препятствием для широкого внедрения технологии получения биоэтанола из лигноцеллюлозной биомассы является более высокая устойчивость субстрата к расщеплению по сравнению с традиционными субстратами – крахмалом и сахаром, что приводит к необходимости проведения дорогих стадий предобработки сырья и обязательной делигнификации. [36, 37].

Базидиальные грибы, являющиеся ксилотрофами, имеют достаточно развитый ферментный аппарат, с помощью которого возможно протекание процесса полного расщепления лигноцеллюлозного комплекса и синтез этанола, то есть, они могут быть эффективно использованы на всех стадиях процесса получения биоэтанола [50, 51].

Предобработка лигноцеллюлозного сырья с использованием базидиальных грибов

Предобработка лигноцеллюлозы является необходимой стадией, оказывающей влияние на эффективность всех последующих стадий процесса получения биоэтанола. Цель предобработки – уменьшение степени кристалличности целлюлозы, разрушение матрикса из лигнина и гемицеллюлоз, и, как следствие, увеличение биодоступности субстрата [5]. Выделяют следующие критерии эффективности предобработки:

- предотвращение деструкции целлюлозы и гемицеллюлоз;
- предотвращение образования ингибиторов ферментов и токсичных для микроорганизмов соединений;
- удаление лигнина;
- высокий выход сахаров в результате ферментативного гидролиза предобработанного субстрата;
- низкие энергетические затраты;
- низкие капитальные затраты;
- возможность промышленного применения выбираемого способа предобработки [52, 53].

Все способы предобработки разделяют на: физические (измельчение, дробление, облучение), химические (предобработка щелочами, кислотами, окисляющими реагентами и органическими растворителями), физико-химические («паровой взрыв», «аммонийный взрыв», окисление в водной фазе) и биологические [36].

Физический способ предобработки является необходимым для любого вида лигноцеллюлозы, так как позволяет оптимизировать объём загружаемого

сырья. Предобработка сырья физико-химическими способами в промышленном масштабе является капиталоемкой и энергоёмкой [54].

Химические способы с использованием кислот или щелочей, являются наиболее распространенными в настоящее время, так как позволяют добиться высокой степени делигнификации сырья [55]. Однако применение химических реагентов может приводить к деструкции гемицеллюлозы и целлюлозы с образованием токсичных веществ, таких как органические кислоты и фурановые соединения [56, 57]. Биологический метод предобработки лигноцеллюлозной биомассы основывается на способности различных микроорганизмов разрушать лигнин. Преимущество такого метода заключается в том, что ферментативная делигнификация протекает в мягких условиях и не приводит к образованию токсичных отходов, требующих утилизации, то есть данный способ является наиболее экологически безопасным [58].

Среди различных живых организмов, базидиальные грибы обладают уникальной природной способностью к синтезу лигно- и целлюлозолитических ферментов, позволяющих подвергать биодеструкции различные органические соединения растительного и животного происхождения, получая все необходимые компоненты для своей жизнедеятельности [59, 60]. Наиболее изученными видами базидиальных грибов, эффективно биодеструктирующими лигноцеллюлозу, являются *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes hirsuta*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Ceriporia lacerata*, *Stereum hirsutum*, *Polyporus brumalis*, *Echinodontium taxodii* [58, 61, 62]. Эффективность биодеструкции указанными штаммами приведена в таблице 1.

Таблица 1 - Осахаривание лигноцеллюлозных субстратов штаммами базидиальных грибов

№	Штамм	Условия предобработки	Убыль, % масс.		Выход сахаров
			Лигнин	Холоцеллюлоза	
1	<i>P. chrysosporium</i> ATCC 24725	Погруженное культивирование, 150 об/мин, концентрация субстрата 55 г/л, 39 °С, 14 суток	25,2	-	-
2	<i>P. chrysosporium</i> CGMCC5.776	Твердофазное культивирование, 29 °С, 15 суток, влажность	34,3	10,0	47,3% (культуральный фильтрат)

		субстрата 70%			<i>Trichoderma viride</i> GMCC 3.2876, 50 ° С, 96 часов)
3	<i>P. chrysosporium</i> КЗ	Твердофазное культивирование, 37 °С, 20 суток, влажность субстрата 300%	18,9	55,7	18 г/л (121 ° С, 60 мин, 3,5% серная кислота)
4	<i>P. chrysosporium</i> КЗ	Твердофазное культивирование, 37 °С, 20 суток, влажность субстрата 400%	20,2	48,9	8 г/л (121 ° С, 60 мин, 3,5% серная кислота)
5	<i>P. cinnabarinus</i> ATCC 2004378	Твердофазное культивирование, 37 °С, 20 суток, влажность субстрата 300%	19,1	10,6	20 г/л (121 ° С, 60 мин, 3,5% серная кислота)
6	<i>P. cinnabarinus</i> ATCC 2004378	Твердофазное культивирование, 37 °С, 20 суток, влажность субстрата 400%	16,1	6,6	7 г/л (121 ° С, 60 мин, 3,5% серная кислота)
7	<i>C. subvermispora</i> ATCC 96608	Твердофазное культивирование, 28 °С, 18 суток, влажность субстрата 75%	29,5	4,6 - целлюлоза; 18,3 - гемицеллюлозы	57,7% (коммерчески й препарат целлюлаз SpezymeCP, 50 ° С, 72 часа)
8	<i>C. subvermispora</i> ATCC 90467	Твердофазное культивирование, 28 °С, 30 суток, влажность субстрата 170%	16,7	4,7- целлюлоза 25,1 – гемицеллюлозы	17,2% (препарат целлюлаз <i>Trichoderma reesei</i> и β-глюкозидазы, 50 ° С, 168 часов)
9	<i>Ceriporia lacerata</i> KUC 8090	Твердофазное культивирование, 30 °С, 8 недель, влажность субстрата 160%, посевной материал 0,1 г высушенного мицелия	13,1	8,0	14.9% (препарат целлюлаз <i>Trichoderma reesei</i> и β-глюкозидазы 50 ° С, 72

					часа)
10	<i>Stereum hirsutum</i> KFRI 234	Твердофазное культивирование, 30 °С, 8 недель, влажность субстрата 160%, посевной материал 0,1 г высушенного мицелия	11,6	10,6	21,0% (препарат целлюлаз <i>Trichoderma</i> <i>reesei</i> и β- глюкозидазы 50 °С, 72 часа)
11	<i>Polyporus</i> <i>brumalis</i> KFRI 20912	Твердофазное культивирование, 30 °С, 8 недель, влажность субстрата 160%, посевной материал 0,1 г высушенного мицелия	14,5	7,8	15,0% (препарат целлюлаз <i>Trichoderma</i> <i>reesei</i> и β- глюкозидазы 50 °С, 72 часа)
12	<i>E. taxodii</i> 2538	Твердофазное культивирование, 25 °С, 30 суток, влажность субстрата 250%	26,0	0,9	-
13	<i>E. taxodii</i> 2538	Твердофазное культивирование, 25 °С, 30 суток, влажность субстрата 250%	23,3	3,3	-
14	<i>T. hirsuta</i> yj9	Твердофазное культивирование, 30 °С, 14 суток, влажность субстрата 300%	41,7	12,0- целлюлоза; 53,0 – гемицеллюлозы	45% (препарат целлюлаз <i>Trichoderma</i> <i>gliodium</i> , 50 ° С, 96 часов)
15	<i>T. hirsuta</i> yj9	Твердофазное культивирование, 30 °С, 42 суток, влажность субстрата 300%	72,0	34,1- целлюлоза; 77,9 – гемицеллюлозы	75 % (препарат целлюлаз <i>Trichoderma</i> <i>gliodium</i> , 50 ° С, 96 часов)

В результате предобработки рисовой шелухи с использованием базидиальных грибов *P. chrysosporium* NBRC (IFO) 31249, *T. versicolor* NBRC (IFO) 4937 и *P. ostreatus* ATCC 66376 в течение 60 суток степень делигнификации составила 21, 37 и 30% соответственно, сократилось содержание целлюлозы в сырье на 49, 58 и 32% [145].

К деструкции лигнина способны базидиальные грибы родов *Trametes* и *Pleurotus* [63, 64]. При культивировании *T. hirsuta* на кукурузных кочерыжках в течение 42 суток масса субстрата уменьшилась на 48%, при этом потеря лигнина, целлюлозы и гемицеллюлоз составила 72, 34 и 78% соответственно [64].

Несмотря на то, что базидиальные грибы способны получать все необходимые питательные вещества из лигноцеллюлозы, установлено, что добавление органических и неорганических соединений способно активировать лигно- и целлюлозолитические ферменты грибов. Например, добавление CuSO_4 в питательную среду позволило значительно увеличить активность лакказ базидиальных грибов *Volvariella volvacea*, *T. trogii* и *P. ostreatus* [95-98], а при предобработке измельченных кукурузных кочерыжек штаммом *P. chrysosporium* ATCC 24725 добавление MnSO_4 в субстрат позволило уменьшить содержание лигнина в сырье на 41% за 3 недели предобработки [65].

Для осуществления процессов предобработки лигноцеллюлозного сырья перспективными являются базидиальные грибы, которые способны деструктировать лигнин без разрушения целлюлозы, например, таким грибом является *Ceriporiopsis subvermispora* [66]. На примере предобработки стеблей бамбука в процессе скрининга из 34 культур базидиомицетов был отобран штамм *E. taxodii* 2538, способный удалить до 24% лигнина без разрушения целлюлозы за 4 недели [67]. Ещё в одном исследовании при использовании такого же субстрата степень делигнификации штаммом *Punctularia sp.1* TUF20056 за 12 недель составила 54%, в то время как потери холоцеллюлозы не превышали 3% [68]. За 12 недель эксперимента штаммы *Perenniporia medulla-panis* и *Phlebia tremellosa* показали высокую лигнинолитическую активность при использовании в качестве субстрата березовой древесины (убыль лигнина составила 73 и 75% соответственно, при этом, убыль целлюлозы не превышала 3%), а за 30 дней эксперимента не произошло убыли целлюлозы при частичной убыли лигнина при предобработке сосновой древесины штаммом *Ruspororus cinnabarinus* [69].

Важным аспектом, влияющим на эффективность предобработки, помимо самих штаммов и исходных субстратов, являются условия проведения эксперимента, такие как температура, аэрация и др. Интенсивная аэрация является важнейшим условием проведения эксперимента, так как делигнификация является окислительным процессом. Для облегчения проникновения свободного кислорода между частицами сырья используется такой физический метод предобработки, как измельчение. Однако степень измельчения имеет свой оптимум. Например, при использовании щепы (размер частиц $40 \times 30 \times 4$ мм) степень делигнификации

составила 13%, при использовании древесной стружки (размер частиц 3 мм) – 31%, дальнейшее измельчение субстрата не способствовало интенсификации процесса, так как происходило уменьшение диффузии кислорода из-за уплотнения слоя субстрата [17]. Сходные результаты получились при твердофазной предобработке корневища рапса с размером частиц 0,4-0,8 мм базидиомицетом *P. ostreatus* NRRL 2366: степень делигнификации составила 36%, уменьшение размера частиц привело к сокращению степени делигнификации до 15% [70, 71].

Учитывая то, что ферменты – вещества белковой природы, их активность сильно зависит от температуры. Для грибов эффективным диапазоном температур, при котором сохраняется активность ферментов является диапазон 20-36 °С. Однако для каждого штамма оптимум может сильно различаться как в пределах указанного диапазона, так и за его пределами. При биодеструкции грибом *Collybia dryophila* березовых листьев содержание лигнина и холоцеллюлозы в субстрате уменьшилось на 72,8 и 27,7% соответственно при температуре 20 °С, и на 32,9 и 6,4% соответственно при температуре 10 °С. Для гриба *T. versicolor* за 3 недели предобработки при температуре 25 °С содержание лигнина в исходном субстрате сократилось на 15%, а при температурах 20 °С и 35 °С – на 8 и 4% соответственно. Оптимумом делигнификации для штамма *Merulius tremellosus* PRL 2845 является диапазон 25-30 °С (с убылью лигнина более 30% за 8 недель эксперимента), а для штамма *C. subvermispora* ATCC 96608 оптимум обнаружился при температуре 28 °С [72].

Помимо вышесказанного, немаловажную роль на активность ферментов играет агрегатное состояние питательной среды. Показано, что в погружённых культурах возрастает активность гидролаз [71, 73], а при твердофазном возрастает активность лакказ и Mn-пероксидаз. Данный факт был установлен для штаммов *Lentinus edodes* и грибов рода *Pleurotus*.

Основным недостатком биологических способов предобработки является низкая скорость процессов делигнификации, поэтому необходимо сочетать данный способ с другими методами предобработки [36]. Так, например, сочетание биологической предобработки соломы с помощью гриба *T. versicolor* и «парового взрыва» позволило уменьшить содержание лигнина в сырье на 75%, в то время как физические методы позволяют уменьшить количество лигнина в среде только на 31% [74].

Ферментативный гидролиз лигноцеллюлозного сырья

Ферментативный гидролиз представляет собой наиболее эффективный метод получения моносахаров из лигноцеллюлозной биомассы [75]. По субстрату, который, преимущественно, утилизируют базидиальные грибы (лигнин или целлюлоза), последние разделяют на грибы белой и бурой гнили соответственно. Однако исследования соломы показали, что грибы белой гнили потребляют не только лигнин, но и полисахариды, благодаря развитому ферментативному аппарату. Так, штаммы *Bjerkandera adusta* CBS 595.78 и *Fomes fomentarius* IJFM A166 как целлюлозу (на 45 и 54% соответственно за 21 сутки культивирования), так и гемицеллюлозы (на 43 и 51% соответственно), *Stereum hirsutum* IJFM A793 преимущественно целлюлозу (на 43%), а *Pycnoporus coccineus* IJFM A780 полностью разрушает гемицеллюлозы (на 98%) и в меньшей степени целлюлозу (на 31%) [76]. Тем не менее, зачастую грибы бурой гнили способны наиболее активно деструктировать целлюлозу (без удаления лигнина). При сравнении активности гидролитических ферментов на древесине эвкалипта было отмечено, что активность ферментов у штаммов *Laetiporus sulphureus* и *Wolfiporia cocos* в два раза выше, чем у грибов белой гнили *P. tremellosa* и *T. versicolor* на [77]. В ряде исследований было показано, что большинство грибов бурой гнили (кроме *Coniophora puteana*, *Fomitopsis pinicola*, *Fomitopsis palustris*) не обладают целлобиогидролазной активностью, необходимой для разрушения кристаллической структуры целлюлозы [78, 79]. Однако показано, что погруженном культивировании на среде с 2% микрокристаллической целлюлозы марки Avicel, гриб *F. palustris* продуцирует полный комплекс целлюлаз и снижает степень кристалличности микрокристаллической целлюлозы с 83 до 75,5% за 14 суток [78]. Показано, что снижение степени кристалличности целлюлозы влияет время культивирования: за 4 недели роста на сосновой древесине штаммы *Coniophora puteana* и *Serpulala crymans* деструктировали 20% субстрата, *Gloeophyllum trabeum* уменьшил массу субстрата на 17,2% за 2 недели. При последующем культивировании (до 12 недель) *G. trabeum* и *S. lacrymans* отмечено уменьшение степени кристалличности целлюлозы соответственно с 45 до 20 и 38% [80].

Помимо непосредственного использования базидиальных грибов в качестве источников ферментов, известны варианты использования ферментных препаратов целлюлаз и гемицеллюлаз из базидиальных грибов. Для их использования проводились работы по изучению процессов накопления ферментов. Так, наибольшая целлюлазная активность для штамма *Armillaria*

gemina SKU2114 была достигнута на 10 сутки погруженного культивирования гриба на среде, содержащей рисовую шелуху в качестве единственного источника углерода. После проведения исследования фермент был выделен, очищен и было проведено осахаривание измельченной биомассы тополя, сосны и овсяницы тростниковой (размер частиц 6-35 мм); выходы простых сахаров составили от 27 до 60% от теоретически возможного [81]. Показана возможность комбинированного использования культуральной жидкости, содержащей ферменты, для деструкции сосновой щепы. Так, при использовании фильтрата культуральной жидкости гриба *L. sulfureus* обеспечило невысокий выход сахаров (45,4 мг/г сухого субстрата) после 48 часов гидролиза, однако, при добавлении культуральной жидкости *F. pinicola* выход простых сахаров увеличился на 34% и составил 60,9 мг/г сухого субстрата, при этом степень кристалличности целлюлозы сократилась с 68,4 до 60,2% [82].

Одной из проблем, с которой зачастую сталкиваются при проведении процессов ферментативного гидролиза, является ингибирование ферментов продуктами реакции – целлобиозой и глюкозой. Для снижения ингибирующего действия продуктов реакции предлагаются использование высокой концентрации гидролитических ферментов, добавление ферментных препаратов β -гликозида в процессе осахаривания (деструктирующих целлобиозу), удаление продуктов гидролиза ультрафильтрацией и совмещение процессов осахаривания лигноцеллюлозной биомассы и сбраживания. Однако использование целлюлаз является неэффективным с коммерческой точки зрения [82, 83]. С точки зрения экономической эффективности перспективной является SSF-технология получения биоэтанола с использованием базидиальных грибов – активных продуцентов целлюлоз. В качестве примера стоит привести исследование, в котором проводили одновременное осахаривание кукурузных стеблей и сбраживание штаммами *G. trabeum* ATCC 11539 и *Escherichia coli* K011 ATCC 55124 соответственно. При этом выход этанола составил 6,68 г/100 г сухого субстрата [83]. Кроме этого, стоит снова упомянуть гриб *P. chrysosporium*, так как он синтезирует как оксидазы, так и гидролазы, следовательно, позволяет достичь высокого выхода сахаров из не пред обработанного сырья [65, 83, 84]. Такая предобработка может значительно повысить эффективность SSF-процесса получения биоэтанола из лигноцеллюлозного сырья.

Конверсия лигноцеллюлозного сырья в биоэтанол

Одной из наиболее перспективных технологий получения биоэтанола является одностадийный процесс производства или консолидированная биопереработка (consolidate bioprocessing, CBP), предполагающая использование микроорганизмов, которые не только самостоятельно (без внесения коммерческих ферментных препаратов) подвергают деструкции лигноцеллюлозное сырьё, но и одновременно сбраживают его в биоэтанол. Кроме этого, важной особенностью таких микроорганизмов является их устойчивость к повышению концентрации целевого продукта, что делает процесс более технологичным, так как не требуется постоянное отведение целевого продукта, как, например, в случае со штаммом дрожжей *S. cerevisiae* [46].

Лигноцеллюлозное сырьё, в особенности отходы сельского хозяйства и деревоперерабатывающей промышленности, содержит до 20% пентоз (ксилоза и арабиноза), которые не сбраживаются широко применяемым в промышленности вышеупомянутым продуцентом этанола *S. cerevisiae* [85]. В таблице 2 приведены результаты исследований конверсии лигноцеллюлозного сырья в биоэтанол штаммами базидиальных грибов.

Таблица 2 - Конверсия лигноцеллюлозного сырья в биоэтанол штаммами базидиальных грибов

№	Штамм	Условия	Содержание субстрата в среде	Выход спирта
1	<i>Phlebia sp.</i> MG-60	28 °С, 10 суток, микроаэрофильные условия	9,1% об.	25,9 г/л (46,7% от теоретически возможного)
2	<i>Phlebia sp.</i> MG-60	28 °С, 10 суток, микроаэрофильные условия	2 % об.	8,6 г/л (72,1% от теоретически возможного)
3	<i>Phlebia sp.</i> MG-60	28 °С, микроаэрофильные условия, 20 суток	10 г/л	43,9% от теоретически возможного
4	<i>G. trabeum</i> ATCC 11539	Твердофазное культивирование в течение 48 часов в	-	3,3 г/100 г субстрата

		аэробных условиях с последующим инкубированием в анаэробных условиях в течение 288 часов, 37 °С		
5	<i>F. velutipes</i>	25 °С, 12 суток	20 г/л	0,05 л/кг субстрата
6	<i>T. hirsuta</i>	96 часов, 28 °С, анаэробные условия	20 г/л	4,3 г/л (78,8% от теоретически возможного)
7	<i>T. hirsuta</i>	28 °С, анаэробные условия, 96 часов,	20 г/л	3,0 г/л (57,4% от теоретически возможного)
8	<i>T. versicolor</i> КТ9427	28 °С, анаэробные условия, 96 часов	20 г/л	4,8 г/л (91% от теоретически возможного)
9	<i>F. palustris</i> BC315	28 °С, анаэробные условия, 72 часа	20 г/л	2,8 г/л
10	<i>N. lepidus</i> RS1911	28 °С, микроаэрофильные условия, 24 часа	20 г/л	2,8 г/л

Одной из проблем, с которой сталкиваются исследователи при сбраживании модельных субстратов с использованием базидиальных грибов является тот факт, что не все базидиомицеты способны сбраживаться все модельные сахара (в качестве которых обычно выбирают те, которые являются мономерами целлюлозы и гемицеллюлоз). Так, бывло показано, что штамм *T. suaveolens* продуцирует биоэтанол из всех гексоз (выход спирта 0,41-0,45 г/г сахара), кроме фруктозы и галактозы, а штамм *P. cinerea* не сбраживает галактозу (выход спирта 0,30-0,37 г/г сахара). Однако время максимального накопления биоэтанола крайне велико: 20±2 суток и оба штамма не способны сбраживать ксилозу и арабинозу. [49]. Штамм *T. hirsuta* обладает способностью к сбраживанию глюкозы и маннозы при начальной концентрации сахаров 20 г/л

в микроаэрофильных условиях. При этом выход спирта составляет 9,7 и 9,6 г/л соответственно за 72 часа эксперимента.

В случае фруктозы и галактозы через 144 часа инкубирования выходы спирта составили соответственно 5,4 и 3,3 г/л. Важным фактом является то, что штамм *T. hirsuta* эффективно сбраживает ксилозу, но в меньшей степени арабинозу, максимальные выходы биоэтанола составили 3,9 и 1,1 г/л на 6 сутки [180]. Важно отметить, к сбраживанию ксилозы обнаружена у ряда штаммов *F. palustris* BC315, *T. versicolor* KT9427 и *Neolentinus lepideus* RS1911 (1,6, 7,9, 6,5 г/л соответственно при начальной концентрации ксилозы 20 г/л и времени инкубирования до 144 часов) [88, 89]. Учитывая тот факт, что повышенная концентрация исходного субстрата может подавлять жизнедеятельность базидиальных грибов, было проведено исследование возможности сбраживания высококонцентрированных растворов сахаров штаммом *Flammulina velutipes* Fv-1, и отмечено, что штамм способен сбраживать высококонцентрированные растворы сахаров (15% масс.) с выходом биоэтанола 40-60 г/л (до 83% от теоретически возможного) на 20 сутки в анаэробных условиях [91]. Однако *F. velutipes* обладает низкой целлюлозной активностью, что было показано в исследовании при использовании в качестве субстрата рисовой шелухи. Выход этанола составил всего 5,6% от теоретически возможного на 15 сутки. Наряду с *F. velutipes* показана высокая эффективность штамма *T. hirsuta* в процессе получения биоэтанола из различных субстратов (20 г/л), таких как крахмал, пшеничные отруби и рисовая шелуха – 9,1 4,3 и 3,0 г/л биоэтанола соответственно на 4 сутки эксперимента [90]. При использовании штамма *Phlebia sp.* MG-60 для сбраживания древесины дуба в концентрации 10 г/л максимальный выход этанола был достигнут на 20-е сутки культивирования и составил 43,9% от теоретически возможного [86].

Как уже было отмечено выше, не все процессы сбраживания проходят в анаэробных условиях. Сбраживание сахаров может также идти в микроаэрофильных (полу анаэробных) или аэробных условиях. Несомненно, более эффективно процессы сбраживания происходят при низкой концентрации кислорода. Сравнение влияния степени аэрации на процесс сбраживания показало, что при погруженном культивировании штамма *T. suaveolens* в аэробных условиях в течение 10 суток на среде, содержащей 20 г/л глюкозы, было получено 1,3 г/л этанола, а в результате сбраживания в микроаэрофильных условиях 7,7 г/л на 18 сутки [92]. Однако при полном отсутствии кислорода в среде процессы сбраживания протекают менее

интенсивно, чем в полу анаэробных условиях. Исследование показало, что штамм *N. lepidus* RS1911 более эффективно сбраживает ксилозу в спирт в микроаэрофильных условиях, нежели в анаэробных 6,5 г/л за 4 суток и 6,7 г/л за 8 суток соответственно [89]. Кроме этого показана возможность сочетания твердофазного культивирования и последующего сбраживания кукурузных стеблей штаммом *G. trabeum* ATCC 11539, при этом выход биоэтанола достигал 3,3 г/100 г субстрата [87].

Учитывая природную особенность базидиальных грибов к продуцированию комплекса ферментов, активно утилизирующих лигноцеллюлозное сырье, и нехарактерную для них особенность к сбраживанию субстратов в биоэтанол, базидиальные грибы являются перспективными организмами для использования их в процессах консолидированной биопереработки. Эффективность процессов с их участием обуславливается особенностями условий культивирования, которые могут быть подобраны в процессе оптимизации состава питательных сред и параметров культивирования. [84, 93].

Список литературы (References):

1. Hamelinck, C. N. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle-and long-term / C. N. Hamelinck, G. Van Hooijdonk, A. P. C. Faaij // Biomass and bioenergy. – 2005. – Т. 28. – №. 4. – С. 384-410.
2. Шаймурадов, Р. Р. Оптимизация производства сухих кормовых дрожжей спиртовых заводов / Р.Р. Шаймурадов, И.В. Логинова, Р.Т. Валеева, М.В. Харина, С.Г. Мухачев // Аннотации сообщений «Научной сессии КГТУ» – Казань, 2011. – 2011.
3. Нефтехимические биотехнологии: вызовы и возможности для России [Электронный ресурс]. – 2014. – Режим доступа: <https://www.rupec.ru>
4. Limayem, A. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: current perspectives, potential issues and future prospects / A. Limayem, S.C. Ricke // Progress in Energy and Combustion Science. – 2012. – Vol. 38. – №. 4. – pp. 449-467.
5. Jørgensen, H. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities / H. Jørgensen, J.B. Kristensen, C. Felby // Biofuels, Bioproducts and Biorefining. – 2007. – Vol. 1. – №. 2. – pp. 119-134.

6. Sánchez, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi / C. Sánchez // *Biotechnology advances*. – 2009. – Vol. 27. – №. 2. – pp. 185-194.
7. Билай, В.И. Основы общей микологии: Учеб. пособие для вузов. - 2-е изд., перераб. и доп. / В.И.Билай – Киев: Вища школа. Головное изд-во. –1980. – 360 с.
8. Taherzadeh, M. J. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review / M.J. Taherzadeh, K. Karimi // *International journal of molecular sciences*. – 2008. – Vol. 9. – №. 9. – Pp. 1621-1651.
9. Alonso, D.M. Bimetallic catalysts for upgrading of biomass to fuels and chemicals / D.M. Alonso, S.G., Wettstein, J.A. Dumesic // *Chemical Society Reviews*. – 2012. – Т. 41.– № 24. – Pp. 8075-8098.
10. Pierson, Y. Alcohol Mediated Liquefaction of Lignocellulosic Materials: A MiniReview / Y. Pierson, F. Bobbink, N. Yan // *Chemical Engineering & Process Techniques*. – 2013. – Т.2. – №1.– P.1014.
11. Ralph, J. Lignin-ferulate cross-links in grasses: active incorporation of ferulate polysaccharide esters into ryegrass / J. Ralph, J.H. Grabber, R.D. Hatfield // *Carbohydrate Research*. – 1995. – Т. 275. – №. 1. – Pp. 167-178.
12. Balat, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review / M. Balat // *Energy conversion and management*. – 2011. – Vol. 52. – №. 2. – Pp. 858-875.
13. Zeng, Y. Lignin plays a negative role in the biochemical process for producing lignocellulosic biofuels / Y. Zeng, S. Zhao, S. Yang, S.-Y. Ding. // *Current opinion in biotechnology*. – 2014. – Vol. 27. – Pp. 38-45.
14. А. П., Гусаков А. В., Черноглазов В. М. Биоконверсия Синицын лигноцеллюлозных материалов: Учебное пособие. / А.П. Синицын, А.В. Гусаков, В.М. Черноглазов – М.: Изд-воМГУ. – 1995. – 224 с.
15. Freudenberg, K. Constitution and Biosynthesis of Lignin / K. Freudenberg, A.C. Neish. – Springer-Verlag Berlin Heidelberg. – 1968. Serial vol. 2. – 132 p. ISBN 978-3-540-04274-7
16. Гарибова, Л.В. Основы микологии: Морфология и систематика грибов и

- грибоподобных организмов. Учебное пособие. / Л.В. Гарибова, С.Н. Лекомцева – Москва: Товарищество научных изданий КМК. – 2005. – 220 с.
17. Дьяков, Ю.Т. Введение в альгологию и микологию: учеб. пособие. / Ю.Т. Дьяков – М.: Изд-во МГУ. – 2000. – 192 с.
 18. Переведенцева, Л.Г. Микология: грибы и грибоподобные организмы: Учебник. 2-е изд., испр. и доп. /Л.Г. Переведенцева – СПб.: Издательство "Лань". – 2012. – 272 с.:ил.
 19. Гарибова, Л.В. Грибы. Энциклопедия природы России. / Л.В. Гарибова, И.И. Сидорова – М.: 1997. – 352 с.:ил.
 20. Мюллер, Э. Микология: Пер.с нем. / Э. Мюллер, В. Лёффлер – М.: Мир. – 1995. – 343 с., ил.
 21. Даниляк, Н.И., Ферментные системы высших базидиомицетов. / Н.И. Даниляк, В.Д. Семичаевский, Л.Г. Дудченко, И.А. Трутнева – Киев: Наукова думка. – 1989. – 280 с.
 22. Green F. Mechanism of brown-rot decay: paradigm or paradox / F. Green, T. L. Highley // International Biodeterioration & Biodegradation. – 1997. – Vol. 39. – №. 2. – Pp. 113-124.
 23. Baldrian, P. Enzymes of saprotrophic basidiomycetes / P. Baldrian // British Mycological Society Symposia Series. – Academic Press, 2008. – Vol. 28. – Pp. 19-41.
 24. Sánchez, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi / C. Sánchez // Biotechnology advances. – 2009. – Vol. 27. – №. 2. – Pp. 185-194.
 25. Биотехнология: учебное пособие для вузов. В 8 кн. / Под ред. Н. С. Егорова, В. Д. Самуилова. Кн. 8: Инженерная энзимология / А. В. Березин, А. А. Клесов, В. К. Швядас и др. М.: Высшая школа. – 1987. – 143 с.
 26. Биотехнология. Принципы и применение. Пер. с англ. / Под ред. И. Хиггинса, Д. Беста, Дж. Джонса. – М.: Мир. – 1988. – 480 с.
 27. Рабинович, М.Л. Теоретические основы биотехнологии древесных композитов / М.Л. Рабинович, А.В. Болобова, В.И. Кондращенко // Кн. 1: Древесина и разрушающие её грибы. М.: Наука, 2001. 264 с.

28. Рабинович, М.Л., Болобова А.В., Васильченко Л.Г. Разложение природных ароматических структур и ксенобиотиков грибами (обзор) / М.Л.Рабинович, А.В. Болобова, Л.Г. Васильченко // Прикладная биохимия и микробиология. 2004. Т. 40. № 1. С.5-23.
29. Hyde, S. M. A mechanism for production of hydroxyl radicals by the brown-rot fungus *Coniophora puteana*: Fe (III) reduction by cellobiose dehydrogenase and Fe (II) oxidation at a distance from the hyphae S.M. Hyde, P.M. Wood // Microbiology. 1997. – V. 143. – Pp. 259-266.
30. Александрова, Г.П. Влияние состава питательной среды на лигниназную активность базидиомицета *Phanerochaete chrysosporium* / Г.П. Александрова, С.А. Медведева, В.А. Бабкин, В.А. Соловьев, О.И. Малышева, С.З. Иванова // Химия древесины. 1989. – № 6. – С. 77-80.
31. Kirk, T.K. Enzymatic «combustion»: the microbial degradation of lignin / T.K. Kirk, R.L. Farrell // Annual Review of Microbiology. – 1987. – V. 41. – Pp. 465-505.
32. Губернаторова, Т.Н. Моделирование биodeградации многокомпонентного органического вещества в водной среде. 3. Анализ механизмов деструкции лигнина [электронный ресурс] / Т.Н. Губернаторова, Б.М. Долгоносов – Режим доступа: iwrp.ru/upload/iblock/bc6/bc68d2c176de48353e779cdcf37787ab.pdf.
33. Куликова, Н.А. Использование базидиальных грибов в технологиях переработки и утилизации техногенных отходов: фундаментальные и прикладные аспекты / Н.А. Куликова, О.И. Кляйн, Е.В. Степанова, О.В. Королева // Прикладная биохимия и микробиология. – 2011. №6. – С. 619-634.
34. Chum, H. L. A comparison of commercial ethanol production systems from Brazilian sugarcane and US corn / H.L. Chum, E. Warner, J.E.A. Seabra, I.C. Macedo // Biofuels, bioproducts and biorefining. – 2014. – Vol. 8. – № 2. – Pp. 205-223.
35. Galbe, M. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production / M. Galbe, G. Zacchi // Biofuels. – Springer Berlin Heidelberg, 2007.

– Pp. 41-65.

36. Sarkar, N. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview / N. Sarkar, S.K. Ghosh, S. Bannerjee, K. Aikat // *Renewable Energy*. – 2012. – Vol. 37. – №. 1. – Pp. 19-27.
37. Balat, M., Progress in bioethanol processing / H. Balat., C. Öz // *Progress in energy and combustion science*. – 2008. – Vol. 34. – №. 5. – pp. 551-573.
38. Jin, M.J. Consolidated bioprocessing (CBP) of AFEX (TM)-pretreated corn stover for ethanol production using *Clostridium phytofermentans* at a high solids loading / M.J. Jin, C. Gunawan, V. Balan, B.E. Dale // *Biotechnology Bioengineering*. – 2012. – Vol. 109. – pp. 1929–1936.
39. Buruiana, C.T. Bioethanol production from residual lignocellulosic materials: A review-Part 2 / C.T. Buruiana, G. Garrote, C. Vizireanu // *Annals of the University Dunarea de Jos of Galati, Fascicle VI: Food Technology*. – 2013. – Vol. 37. – №. 1. – pp. 25-38.
40. Tomás-Pejó, E. Comparison of SHF and SSF processes from steam-exploded wheat straw for ethanol production by xylose fermenting and robust glucose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains / E. Tomás-Pejó, J.M. Oliva, M. Ballesteros, L. Olsson // *Biotechnology Bioengineering*. – Vol. 100. – 2008. – Pp.1122–1131.
41. Gan, Q. Kinetic dynamics in heterogeneous enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview, an experimental study and mathematical modeling / Q. Gan, S.J. Allen, G. Taylor // *Process of Biochemistry*. – Vol. 38. – 2003. Pp. 1003–1018.
42. Lin, Y. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects / Y. Lin, S. Tanaka // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2006. – Vol. 69. – №. 6. – Pp. 627-642.
43. Ojeba, K. Exergy analysis and process integration of bioethanol production from acid pre-treated biomass: Comparison of SHF, SSF and SSCF pathways / K. Ojeba, E. Sánchez, M. El-Halwagi, V. Kafarov // *Chemical Engineering Journal*. – 2011. – Vol. 177. – Pp.195-201.
44. Lynd, L.R. Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: technology economics, the environment, and policy / L.R. Lynd // *Annual Review*

- of Environment and Resources. – Vol. 21. – 1996. Pp. 403–465.
45. Spatari, S. Life cycle evaluation of emerging lignocellulosic ethanol conversion technologies / S. Spatari, D. Bagley, H. MacLean // *Bioresource Technology*. – Vol. 101. – 2010. – Pp. 654–667.
 46. Xu, Q. Perspectives and new directions for the production of bioethanol using consolidated bioprocessing of lignocellulose / Q. Xu, A. Singh, E. Himmel // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2009. – Vol. 20. – Pp. 364–371.
 47. Jin, M. Consolidated bioprocessing (CBP) performance of *Clostridium phytofermentans* on AFEX-treated corn stover for ethanol production / M. Jin, V. Balan, C. Gunawan, B.E. Dale // *Biotechnology Bioengineering*. – 2011. – Vol. 108(6). – Pp. 1290–1297.
 48. Cha, M. Metabolic engineering of *Caldicellulosiruptor bescii* yields increased hydrogen production from lignocellulosic biomass / M. Cha, D. Chung, J.G. Elkins, A.M. Guss, J. Westpheling // *Biotechnology for Biofuels*. – 2013. – 6:85.
 49. Chung Daehwan, Cha Minseok, Guss Adam M., Westpheling Janet. Direct conversion of plant biomass to ethanol by engineered *Caldicellulosiruptor bescii* / D. Chung, M. Cha, A.M. Guss, J. Westpheling // *PNAS Early Edition* [электронный ресурс]. – 2014. Режим доступа: pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1402210111
 50. Srivastava, A.K. Saccharification with *Phanerochaete chrysosporium* and ethanol production with *Saccharomyces cerevisiae* / A.K. Srivastava // *Journal of Atoms and Molecules*. – 2012. – Vol. 2. – №. 4. – Pp. 321–331.
 51. Mizuno, R. Use of whole crop sorghums as a raw material in consolidated bioprocessing bioethanol production using *Flammulina velutipes* / R. Mizuno, H. Ichinose, T. Maechara, K. Takabatake, S. Kaneko // *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. – 2009. – Vol. 73. – №. 7. – Pp. 1671–1673.
 52. Kumar, P. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production / P. Kumar, D. \M. Barrett, M.J. Delwiche, P. Stroeve // *Industrial & Engineering Chemistry Research*. – 2009. – Vol. 48. – №. 8. – Pp. 3713–3729.

53. Alvira, P. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review / P. Alvira, E. Tomás-Pejó, M. Ballesteros, M.J. Negro // *Bioresource technology*. – 2010. – Vol. 101. – №. 13. – Pp. 4851-4861.
54. Eggeman, T. Process and economic analysis of pretreatment technologies / T. Eggeman, R.T. Elander // *Bioresource technology*. – 2005. – Vol. 96. – №. 18. – Pp. 2019-2025.
55. Mosier, N. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass / N. Mosier, C. Wyman, B. Dale, R. Elander, Y.Y. Lee, M. Holtzapple, M. Ladisch // *Bioresource technology*. – 2005. – Vol. 96. – №. 6. – Pp. 673-686.
56. Klinke, H.B. Characterization of degradation products from alkaline wet oxidation of wheat straw / H.B. Klinke, B.K. Ahring, A.S. Schmidt, A.B. Thomsen // *Bioresource Technology*. – 2002. – Vol. 82. – №. 1. – Pp. 15-26.
57. Tran, A.V. Ethanol fermentation of red oak acid prehydrolysate by the yeast *Pichia stipitis* CBS 5776 / A.V. Tran, R.P. Chambers // *Enzyme and microbial technology*. – 1986. – Vol. 8. – №. 7. – Pp. 439-444.
58. Saritha, M. Biological pretreatment of lignocellulosic substrates for enhanced delignification and enzymatic digestibility / M. Saritha, A. Arora, Lata // *Indian journal of microbiology*. – 2012. – Vol. 52. – №. 2. – Pp. 122-130.
59. ten Have, R. Oxidative mechanisms involved in lignin degradation by white-rot fungi / R. ten Have, P. J.M. Teunissen // *Chemical Reviews*. – 2001. – Vol. 101. – №. 11. – Pp. 3397-3414.
60. Reid, I. D. Solid-state fermentations for biological delignification / I.D. Reid // *Enzyme and microbial technology*. – 1989. – Vol. 11. – №. 12. – pp. 786-803(b).
61. Zhao, L. Fungal pretreatment of cornstalk with *Phanerochaete chrysosporium* for enhancing enzymatic saccharification and hydrogen production / L. Zhao, G.L. Cao // *Bioresource technology*. – 2012. – Vol. 114. – Pp. 365-369.
62. Nazarpour, F. / F. Nazarpour, D.K. Abdullah, N. Abdullah et. Al. // *BioMed research international*. – 2013. – Vol. 2013. Pp. 1-9.
63. Taniguchi, M. Evaluation of pretreatment with *Pleurotus ostreatus* for enzymatic hydrolysis of rice straw / M. Taniguchi, H. Suzuki, D. Watanabe, K. Sakai, K.

- Hoshino, T. Tanaka // *Journal of bioscience and bioengineering*. – 2005. – Vol. 100. – №. 6. – Pp. 637-643.
64. Sun, F. Effect of biological pretreatment with *Trametes hirsuta* yj9 on enzymatic hydrolysis of corn stover / F. Sun, H. Yu, G. Guo, X. Zhang // *International Biodeterioration & Biodegradation*. – 2011. – Vol. 65. – №. 7.
65. Shrestha, P. Solid-substrate fermentation of corn fiber by *Phanerochaete chrysosporium* and subsequent fermentation of hydrolysate into ethanol / M. Rasmussen S.K. Khanal // *Journal of agricultural and food chemistry*. – 2008. – Vol. 56. – №. 11. – Pp. 3918-3924.
66. Ferraz, A. Wood biodegradation and enzyme production by *Ceriporiopsis subvermispora* during solid-state fermentation of *Eucalyptus grandis* / A. Ferraz, A.M. Córdova, A. Machuca // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2003. – Vol. 32. – №. 1. – Pp. 59-65.
67. Zhang, X. Evaluation of biological pretreatment with white rot fungi for the enzymatic hydrolysis of bamboo culms / H. Yu, H. Huang, Y. Liu // *International Biodeterioration & Biodegradation*. – 2007. – Vol. 60. – №. 3. – Pp. 159-164.
68. Suhara, H. Screening of selective lignin-degrading basidiomycetes and biological pretreatment for enzymatic hydrolysis of bamboo culms / H. Suhara, X. Zhang, H. Yu, H. Huang, Y. Liu // *International Biodeterioration & Biodegradation*. – 2012. – Vol. 75. – Pp. 176-180.
69. Blanchette, R.A. Delignification by wood-decay fungi / R.A. Blanchette // *Annual review of phytopathology*. – 1991. – Vol. 29. – №. 1. – Pp. 381-403.
70. Sarikaya, A. Solid-state fermentation of lignocellulosic plant residues from *Brassic anapus* by *Pleurotus ostreatus* / A. Sarikaya, M.R. Ladisch // *Applied biochemistry and biotechnology*. – 1999. – №. 1. – Vol. 1-15. – Pp. 82.
71. Elisashvili, V. *Lentinus edodes* and *Pleurotus* species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition / V. Elisashvili, M. Penninck, E. Kachlishvili, N. Tsiklauri, E. Metreveli, T. Kharziani, G. Kvesitadze // *Bioresource Technology*. – 2008. – Vol. 99. – №. 3. – Pp. 457-462.

72. Reid I. D. Biological delignification of aspen wood by solid-state fermentation with the white-rot fungus *Merulius tremellosus* / I.D. Reid // Applied and environmental microbiology. – 1985. – Vol. 50. – №. 1. – Pp. 133-139.
73. Mazumder S., Basu S. K., Mukherjee M. Laccase production in solid- state and submerged fermentation by *Pleurotus ostreatus* / S. Mazumder, S.K. Basu, M. Mukherjee // Engineering in life sciences. – 2009. – Vol. 9. – №. 1. – Pp. 45-52.
74. Zhang, L. Effect of steam explosion on biodegradation of lignin in wheat straw / L. Zhang, D. Lia, L. Wang // Bioresource technology. – 2008. – Vol. 99. – №. 17. – Pp. 8512-8515.
75. Talebnia, F.I. Production of bioethanol from wheat straw: an overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation / F.I. Talebnia, D. Karakashev, I. Angelidaki // Bioresource Technology. – 2010. – Vol. 101. – №. 13. – Pp. 4744-4753.
76. Salvachúa, D. Fungal pretreatment: an alternative in second-generation ethanol from wheat straw / A. Prieto, M. López-Abelairas, T. Lu-Chau, A.T. Martínez, M.J. Martínez // Bioresource technology. – 2011. – Vol. 102. – №. 16. – Pp. 7500-7506.
77. Machuca, A. Hydrolytic and oxidative enzymes produced by white-and brown-rot fungi during *Eucalyptus grandis* decay in solid medium / A. Machuca, A. Ferraz // Enzyme and Microbial Technology. – 2001. – Vol. 29. – №. 6. – Pp. 386-391.
78. Yoon, J.J. Degradation of crystalline cellulose by the brown-rot basidiomycete *Fomitopsis palustris* / J.J. Yoon, Y.K. Kim // Journal of microbiology (Seoul, Korea). – 2005. – Vol. 43. – №. 6. – Pp. 487-492.
79. Shin, K. Purification and characterization of a thermostable cellobiohydrolase from *Fomitopsis pinicola* / K. Shin, Y.H. Kim, M. Jeya et al. // Journal of microbiology and biotechnology. – 2010. – Vol. 20. – №. 12. – Pp. 1681-1688.
80. Howell, C. Temporal changes in wood crystalline cellulose during degradation by brown rot fungi / C. Howell, A.C.S. Hastrup, B. Goodell, J. Jellison // International Biodeterioration & Biodegradation. – 2009. – Vol. 63. – №. 4. – Pp. 414-419.
81. Jagtap, S. S. Enzymatic hydrolysis of aspen biomass into fermentable sugars by using lignocellulases from *Armillaria gemina* / S.S. Dhiman, T.S. Kim, J. Li, J.K.

- Lee, Y.C. Kang // *Bioresource technology*. – 2013. – Vol. 133. – Pp. 307-314.
82. Lee, J.W. Enzymatic saccharification of biologically pretreated *Pinus densiflora* using enzymes from brown rot fungi / J.W. Lee, H.Y. Kim, B.W. Koo // *Journal of bioscience and bioengineering*. – 2008. – Vol. 106. – №. 2. – Pp. 162-167.
83. Sun, Y. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review / Y. Sun, J. Cheng // *Bioresource technology*. – 2002. – Vol. 83. – №. 1. – Pp. 1-11.
84. Vincent, M. Ethanol production via simultaneous saccharification and fermentation of sodium hydroxide treated corn stover using *Phanerochaete chrysosporium* and *Gloeophyllum trabeum* / M. Vincent, A.L. Pometto, J.H. van Leeuwen // *Bioresource technology*. – 2014. – Vol. 158. – Pp. 1-6.
85. Hahn-Hägerdal B. Bio-ethanol—the fuel of tomorrow from the residues of today / B. Hahn-Hägerdal, M. Galbe, M.F. Gorwa-Grauslund, G. Lidén, G.Zacchi // *Trends in biotechnology*. – 2006. – Vol. 24. – №. 12. – Pp. 549-556.
86. Kamei, I. Direct ethanol production from cellulosic materials by the hypersaline-tolerant white-rot fungus *Phlebia sp.* MG-60 / I. Kamei, J. Hirota, S. Meguro // *Bioresource technology*. – 2012. – Vol. 112. – Pp. 137-142.
87. Rasmussen, M.L. Sequential saccharification of corn fiber and ethanol production by the brown rot fungus *Gloeophyllum trabeum* / M. L. Rasmussen // *Bioresource technology*. – 2010. – Vol. 101.
88. Okamoto, K. Bioconversion of xylose, hexoses and biomass to ethanol by a new isolate of the white rot basidiomycete *Trametes versicolor* / K. Okamoto, A. Uchii, H. Yanase, H. Yanase // *SpringerPlus*. – 2014. – V. 3. – Pp. 1-9
89. Okamoto, K. Efficient xylose fermentation by the brown rot fungus *Neolentinus lepideus* / K. Okamoto, R. Kanawaku, M. Masumoto // *Enzyme and microbial technology*. – 2012. – Vol. 50. – №. 2. – Pp. 96-100.
90. Okamoto, K., Direct ethanol production from starch, wheat bran and rice straw by the white rot fungus *Trametes hirsuta* / K. Okamoto, Y. Nitta, N. Maekawa, H. Yanase // *Enzyme Microbial Technology*. 2011. – V. 48. – № 3. – Pp. 273–277.
91. Maehara, T. Ethanol production from high cellulose concentration by the basidiomycete fungus *Flammulina velutipes* / T. Maehara, H. Ichinose, T. Furukawa, W. Ogasawara, K. Takabatake, S. Kaneko // *Fungal Biology*. – 2013.

– V. 117. – № 3. – Pp. 220-226.

92. Okamoto, K. Production of ethanol by the white-rot basidiomycetes *Peniophora cinerea* and *Trametes suaveolens* / K. Okamoto, K. Imashiro, Y. Akizawa // *Biotechnology letters*. – 2010. – Vol. 32. – №. 7. – Pp. 909-913.
93. Ander P. Selective degradation of wood components by white- rot fungi / P. Ander, K.E. Eriksson // *Physiologi aplantarum*. – 1977. – Vol. 41. – №. 4. – Pp. 239-248.