

Биоконверсия целлюлозосодержащего сырья. Ферментативный гидролиз целлюлозы (обзор литературы)

А.А. Шубаков¹, Е.А. Михайлова², В.В. Мартынов¹

¹ Институт биологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН,

г. Сыктывкар

² Институт физиологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН,

г. Сыктывкар

shubakov.anatol@mail.ru,

elena_elkina@mail.ru,

mar7inov.v@yandex.ru

Аннотация

Лигноцеллюлоза – наиболее распространенный на земле биополимер. Гидролиз лигноцеллюлозы до сбраживаемых сахаров является предпосылкой для ее успешного использования в качестве субстрата для крупномасштабного производства промышленно значимой продукции с добавленной стоимостью. Ферментативный гидролиз лигноцеллюлозы осуществляется ферментами целлюлазами, гемицеллюлазами, лигниназами в синергизме или индивидуально. В обзоре описан ферментативный гидролиз целлюлозы, гемицеллюлозы и лигнина. Даны сведения о твердофазной и глубинной ферментациях микроорганизмов, используемых для получения целлюлаз. Охарактеризованы методы повышения уровня продуцирования и активности целлюлаз. Описано промышленное применение целлюлаз, в том числе для получения биоэтанола.

Ключевые слова:

целлюлазы, гемицеллюлазы, лигниназы, грибы, ферментация, биоэтанол

Введение

Биоконверсия возобновляемого растительного сырья в топливо, кормовые и пищевые продукты, полупродукты для химической и микробиологической промышленности рассматривается как одна из ключевых отраслей биотехнологии. Одно из направлений этой отрасли предусматривает способы превращения непищевого сырья, представляющего собой, в основном, отходы целлюлозно-бумажной промышленности и сельского хозяйства, с помощью ферментов и микроорганизмов для получения биоэтанола, углеводов и биологически активных веществ [1, 2].

В литературе описаны многочисленные методы ферментативного гидролиза целлюлозы и целлюлозосодержащего сырья [3]. Большинство работ в этой области посвящено гидролизу целлюлозы до низкомолекулярных продуктов (глюкозы, целлобиозы). Для направленной деструкции целлюлозы перспективно совмещение химических и биохимических методов.

Bioconversion of cellulose-containing raw material. Enzymatic hydrolysis of cellulose (review)

A.A. Shubakov¹, E.A. Mikhailova², V.V. Martynov¹

¹ Institute of Biology, Federal Research Centre Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar

² Institute of Physiology, Federal Research Centre Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar

shubakov.anatol@mail.ru, elena_elkina@mail.ru,

mar7inov.v@yandex.ru

Abstract

Lignocellulose is the most abundant biopolymer on earth. The hydrolysis of lignocellulose to fermentable sugars is a prerequisite for its successful use as a substrate for the large-scale production of value-added industrial products. Enzymatic hydrolysis of lignocellulose is carried out by cellulases, hemicellulases, and ligninases in synergy or individually. The review describes the enzymatic hydrolysis of cellulose, hemicellulose, and lignin. Information on solid-phase and submerged microorganisms fermentation used to obtain cellulases was given. Methods for increasing the level of production and activity of cellulases were characterized. The industrial application of cellulases, including for the production of bioethanol, was described.

Keywords:

cellulases, hemicellulases, ligninases, fungi, fermentation, bioethanol

Разработка новых ферментных препаратов (далее – ФП), включая технологию и строительство российских заводов по их производству, позволит стране обеспечить независимость от зарубежных поставщиков. Если в качестве катализаторов использовать промышленно доступные ФП, то при масштабировании биотехнологической стадии превращения унифицированной лигноцеллюлозы в растворы сбраживаемых сахаров (с необходимой и достаточной концентрацией) наилучший результат даст определение способов предварительной обработки быстровозобновляемого целлюлозосодержащего сырья (далее – ЦСС), а

также исследование зависимости выхода редуцирующих веществ (далее – РВ) при ферментализации от начальной концентрации субстрата [5].

Можно выделить три основные причины того, что процесс ферментативного гидролиза целлюлозы пока не удается перевести на промышленный уровень: высокая стоимость ферментных препаратов целлюлаз; отсутствие дешевого и эффективного крупномасштабного способа предобработки целлюлозосодержащих материалов, в первую очередь древесины; отсутствие технологий биоконверсии целлюлозы в асептических условиях, позволяющих получать высокую производительность, сопоставимую с уровнем традиционной химической технологии [1, 2].

Целлюлазы занимают третье место среди самых важных промышленных ферментов мирового рынка ($\approx 15\%$) после амилазы ($\approx 25\%$) и протеазы ($\approx 18\%$). Целлюлазы используются в целлюлозно-бумажной, текстильной промышленности, для получения биоэтанола, при обработке пищи, кормов и т.д. [6].

Цель обзора – обобщение современных знаний, касающихся биоконверсии лигноцеллюлозы и ферментативного гидролиза целлюлозы, с учетом имеющихся данных, полученных во второй половине XX – начале XXI в.

Ферментативный гидролиз компонентов растительного сырья. Грибы, продуцирующие лигноцеллюлолитические ферменты, являются широко распространенными и включают виды из аскомицетов (например, *Trichoderma reesei*), базидиомицетов, в том числе грибы белой гнили (например, *Phanerochaete chrysosporium*) и грибы бурой гнили (например, *Fomitopsis palustris*) и, наконец, несколько анаэробных видов (например, *Orpinomyces sp.*), которые деградируют клетчатку в желудочно-кишечном тракте жвачных животных. Деградиация биомассы грибами производится комплексными смесями целлюлаз, гемицеллюлаз и лигниназ, отражая сложный состав лигноцеллюлозных материалов. Целлюлазы и большинство гемицеллюлаз принадлежат к группе ферментов, известных как гликозидгидролазы (GH). К настоящему времени идентифицировано более 2500 GH, сгруппированных в 115 семействах (www.cazy.org) [7].

Микроорганизмы имеют два типа внеклеточных ферментативных систем: гидролитическая система продуцирует гидролазы и является ответственной за деградиацию целлюлозы и гемицеллюлозы; и уникальная окислительная и внеклеточная лигнинолитическая система, деполимеризующая лигнин [6, 8].

Состав продуктов ферментативного гидролиза целлюлозы зависит от состава целлюлазного комплекса ферментов и вида целлюлозосодержащего сырья [9].

Концентрация фермента в реакционной смеси может снижаться в процессе гидролиза по следующим причинам: часть фермента прочно адсорбируется на негидролизуемой фракции целлюлозы; часть остается в растворе, содержащем глюкозу; часть инактивируется в ходе гидролиза [10].

Для достижения высокой конверсии целлюлозы необходимо иметь высокие концентрации ферментов, что увеличивает стоимость производства. Поэтому изучение

микроорганизмов, образующих высокопродуктивные целлюлазы, является очень важным для развития экономических технологий производства [11].

Гидролиз целлюлозы. На ферментативный гидролиз влияют как структурные особенности целлюлозы, так и способ действия фермента. Из-за сложности целлюлозного субстрата и целлюлазной системы механизм гидролиза целлюлозного субстрата до сих пор не полностью понят, хотя детальное знание некоторых аспектов структуры ферментов, молекулярных свойств ферментов и ультраструктуры целлюлозы были получены в результате обширных исследований в течение последних нескольких десятилетий [12].

Целлюлазы – это группа ферментов, которые в совокупности обладают способностью катализировать гидролиз целлюлозы до глюкозы. Полученная глюкоза затем может быть применена в качестве субстрата для получения многих продуктов брожения, включая этанол. Целлюлаза производится в промышленных масштабах с помощью процессов ферментации с использованием *Trichoderma reesei*, анаморфа гриба *Hypocrea jecorina*. Синтез грибной целлюлазы регулируется как индукцией, так и репрессией конечным продуктом – глюкозой. *T. reesei* Rut C30 является штаммом, известным своей более высокой устойчивостью к репрессии глюкозой. Считается, что олигосахариды, образующиеся при гидролизе целлюлозы, играют важную роль в индукции природных целлюлаз [13, 14].

Продукцию целлюлазы можно положительно регулировать, используя целлюлозу в составе среды, в то время как целлюлаза отрицательно регулируется глюкозой и целлобиозой. На транскрипционном уровне продукция целлюлазы может быть повышена комплексами положительных регуляторных факторов *xyr*, *Ace2* и *HAP2/3/5*, в то же время как она репрессируется негативным регуляторным фактором *Cre1* и *Ace1*. Сообщалось, что улучшенные мутантные штаммы продуцируют внеклеточно более 35 г/л белка, и почти весь секретируемый белок состоит из целлюлаз и гемицеллюлаз. Для эффективного гидролиза целлюлозы необходимы синергетические активности целлобиогидролаз (CBHs), эндоглюканаз (EGs) и β -глюкозидаз. Напротив, гемицеллюлолитическая система состоит из более сложного набора ферментов, среди которых имеются две эндо- β -ксилаказы, β -маннаназа и ферменты, расщепляющие боковые цепи. Продукция основных целлюлаз в *Trichoderma* регулируется на уровне транскрипции, в зависимости от имеющегося источника углерода, гены репрессируются глюкозой и индуцируются в несколько тысяч раз целлюлозой или дисахаридом софорозой. Углерод-катаболитная репрессия генов целлюлазы была широко изучена и показано, что репрессорный ген *Cre1 Trichoderma* опосредует репрессию глюкозой экспрессии целлюлазы. В различных условиях изучали экспрессию основных генов целлюлазы – *cbh1*, *cbh2*, *egl1* и *egl2*. Анализ относительных уровней экспрессии различных генов целлюлазы на разных источниках углерода и индуцирующих соединениях указывает на то, что действуют несколько регуляторных механизмов, некоторые из которых могут быть общими для

генов, кодирующих целлюлазы и гемицеллюлазы. Тем не менее доступно достаточно мало информации по молекулярному механизму, участвующему в активации генов целлюлазы [15].

Грибные целлюлазы (гидролиз β -1,4-гликозидных связей) в основном встречаются в нескольких семействах гликозилгидролаз (GH): 5, 6, 7, 8, 9, 12, 44, 45, 48, 61 и 74 [16]. Грибные целлюлазы являются простыми и модульными ферментами с функционально различными модулями или доменами. Некоторые из них обладают двумя доменами, каталитическим и углевод-связывающим, связанными через серин- и треонин-обогащенный полилинкер с варьирующими длиной и структурой цепи [6]. Углевод-связывающие модули различаются по размеру и богаты ароматическими и полярными аминокислотными остатками, которые иммобилизуют субстрат во время катализа. Активный сайт каталитического домена может иметь топологическую форму туннеля, ключа или кармана, что позволяет эффективно проводить гидролиз субстрата [17, 18].

Целлюлазные системы мезофильных грибов *Trichoderma reesei* и *Phanerochaete chrysosporium* наиболее изучены. *T. reesei* обладает двумя генами, кодирующими экзоглюканазу, восемью – для эндоглюканаз и семью – для глюкозидаз [6]. *P. chrysosporium* имеет несколько β -глюкозидаз, тогда как только один изофермент был описан в *T. reesei*. Некоторые термофильные грибы могут деградировать целлюлозу быстрее, чем *T. reesei* [8]. Эффективными целлюлолитическими грибами также являются виды *Aspergillus*, *Penicillium*, *Chaetomium*, *Fusarium*, *Stachybotrys*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Acremonium*, *Ceratocystis*, *Myrothecium*, *Humicola* и др. Виды *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium* и *Sclerotium* являются хорошими продуцентами целлюлаз и в основном рассматриваются для коммерческих целей [6].

Среди аэробных целлюлолитических бактерий виды из родов *Cellulomonas*, *Pseudomonas* и *Streptomyces* наиболее изучены. Приблизительно 5–10 % целлюлозы разлагается в природе при анаэробных условиях. Лучше всего охарактеризована целлюлазная система *Clostridium thermocellum*, строго анаэробной грамположительной, спорулирующей бактерии. В этой системе ферменты организованы в большие функциональные объекты, названные целлюлосомами [8].

Ферментативный гидролиз целлюлозы происходит в результате последовательно-параллельного действия нескольких ферментов, входящих в состав так называемого целлюлазного комплекса [19]. Микроорганизмы, способные разлагать целлюлозу, продуцируют набор ферментов с различными специфичностями, работающих в синергизме. Целлюлазы гидролизуют β -1,4-гликозидные связи целлюлозы. Традиционно они делятся на два класса, упоминаемые как эндоглюканазы и целлюбиогидролазы. Эндоглюканазы (эндо-1,4- β -глюканазы, эндо- β -1,4-D-глюкан-4-глюканогидролазы, EGs, EC 3.2.1.4) могут гидролизовать внутренние связи (предпочтительно в аморфных областях целлюлозы), освобождая новые терминальные концы. Целлюбиогидролазы (экзоглюканазы,

экзо-1,4- β -D-глюканазы, CBHs, EC 3.2.1.91) действуют на существующие или образованные эндоглюканазой концы цепи. Оба фермента могут деградировать аморфную целлюлозу, но за некоторыми исключениями. CBHs являются единственными ферментами, эффективно разлагающими кристаллическую целлюлозу. CBHs и EGs высвобождают молекулы целлобиозы. Для эффективного гидролиза целлюлозы также требуются β -глюкозидазы (β -D-глюкозидглюкангидролазы, EC 3.2.1.21), которые гидролизуют целлобиозу, высвобождая две молекулы глюкозы [3, 6, 8].

Ферменты в культуральном супернатанте могут быть очищены классическими методами, включая осаждение, диализ и очистку на колонке. Для очистки целлюлазы применяются различные типы колонок, наиболее популярной матрицей для гель-эксклюзионной хроматографии является сефадекс [20].

Требуется определение оптимальной температуры и pH целлюлазы для эффективного использования в промышленности. Большинство грибных целлюлаз активны при температуре от 40 до 70 °C, по своей природе являясь ацидофильными [6].

Различные ионы металлов и химические соединения могут влиять на целлюлазную активность. Сообщалось, что ионы металлов Hg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Ag^+ , Mn^{2+} , K^+ незначительно или полностью ингибируют целлюлазу, в то время как ионы Ca^{2+} , Na^+ и Co^{2+} стимулируют или не влияют на активность целлюлазы [21]. Некоторые химические вещества, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), додецилсульфат натрия (SDS), дициклогексилкарбодимид, натрий азид, β -меркаптоэтанол, дитиотреитол, тритон X-100, мочевины и др., могут увеличить, уменьшить или отменить активность ферментов [22].

Молекулярный вес целлюлаз, продуцируемых различными видами грибов, может варьировать от 12 до 126 кДа [23]. Грибная целлюлаза в природе может быть мономерной или димерной [24, 25].

Стоимость производства и низкий выход целлюлазы являются основными ограничениями в экономике процесса, что препятствует их применению в промышленности. Поэтому открытие новых микробных видов или мутантных штаммов, секретирующих более высокие уровни целлюлаз, все еще актуальная область исследований, чтобы развить экономически конкурентоспособную стратегию биопроцесса, которую можно применять в больших масштабах [26].

Гидролиз гемицеллюлозы. Так же, как и целлюлазы, большинство гемицеллюлаз являются гликозидгидролазами (GHs), хотя некоторые гемицеллюлазы относятся к углеводным эстеразам (CEs), которые гидролизуют эфирные связи боковых групп ацетата или феруловой кислоты [27].

Гемицеллюлазы относятся к 20 разным семействам GH (1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 11, 26, 27, 36, 39, 43, 51, 52, 53, 54, 57, 62 и 67), и все они, за исключением четырех (семейства 4, 8, 52 и 57), были найдены в грибах [16]. Как и целлюлазы, аэробные грибы, такие как *Trichoderma* и *Aspergillus*, секретируют широкий спектр гемицеллюлаз в высоких концентрациях, и они работают синергетически [27].

Гемицеллюлазы классифицируют в соответствии с их действием на различные субстраты. Ксилан является основным углеводом, обнаруженным в гемицеллюлозе. Он гидролизуется действием эндо-1,4-β-ксилазы и ксилан 1,4-β-ксилозидазы. Первая образует олигосахариды; вторая расщепляет олигосахариды до ксилозы. Кроме того, биодеградация гемицеллюлозы требует вспомогательных ферментов, таких как ксилан-эстеразы, эстеразы феруловой и p-кумаровой кислот, α-1-арабинофуранозидазы и α-4-0-метилглюкуронозидазы, действующие синергически для эффективного гидролиза ксиланов и маннанов древесины. В случае 0-ацетил-4-0-метилглюкуронксилана одной из самых распространенных гемицеллюлоз для деградации требуются четыре разных фермента: эндо-1,4-β-ксилаза (эндоксилаза), ацетилэстераза, α-глюкуронозидаза и β-ксилозидаза. Деградация 0-ацетилгалактоглокоманна начинается с разрыва полимера эндоманназами. Ацетилглюкоманновые эстеразы удаляют ацетильные группы, и α-галактозидазы – остатки галактозы. Наконец, β-маннозидаза и β-гликозидаза расщепляют генерируемые эндоманназами олигомеры с β-1,4 связями. Глюкоманнан-деградирующие ферменты были описаны реже, чем ксиланазы. Изучено несколько микробных манназ из грамположительных и грамотрицательных бактерий. Эндоманназы также были описаны в грибах белой гнили и аскомицетах. Большинство изученных α-галактозидаз и ацетилглюкоманновых эстераз описаны из рода *Aspergillus*, в то время как наиболее изучены β-маннозидазы из грибов *Polyporus sulfureus* и *A. niger*. На сегодняшний день ни α-галактозидазы, ни β-маннозидазы не были выделены из грибов белой гнили [8].

Гидролиз лигнина. Базидиомицеты белой гнили, такие как *Coriolus versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* и *Trametes versicolor*, признаны наиболее эффективными из изученных лигнин-разрушающих микроорганизмов. К лигниназам относятся два лигнолитических семейства: фенолоксидазы (лакказы) и пероксидазы [лигнинпероксидаза (LiP) и марганец-зависимая пероксидаза (MnP)]. По-видимому, для проведения деградации лигнина эти ферменты действуют, используя низкомолекулярные посредники [8, 28].

Лигниназы расщепляют лигнин на соединения с низкой молекулярной массой, далее ассимилируемые другими микроорганизмами. Лакказы (ЕС 1.10.3.2) являются медь-содержащими гликопротеинами, которые могут быть по своей природе мономерными, димерными или тетрамерными. Лакказы участвуют в деградации лигнина посредством окисления фенольных соединений с образованием фенокси-радикалов и хинонов. *Aspergillus nidulans*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Lentinula edodes*, *Phellinus ribis*, *Pleurotus pulmonarius* являются известными продуцентами лакказ. Пероксидазы входят в семейство оксидоредуктаз, катализирующих деполимеризацию лигнина с использованием H₂O₂. Лигнин-пероксидаза (ЕС 1.11.1.14), обладающая высоким окислительно-восстановительным потенциалом с низким оптимальным pH (pH~ 3), относится к гемовым белкам [29].

Лигнин-пероксидаза менее специфична для своих субстратов и окисляет широкий спектр фенольных, ароматических, нефенольных и органических субстратов. Напротив, марганец-пероксидазы (ЕС 1.11.1.13) используют Mn²⁺ в качестве донора электронов и окисляют фенольные структуры до феноксильных радикалов [30].

Окислительные механизмы деградации лигноцеллюлозы в высших грибах. Неферментативный механизм деградации лигноцеллюлозы в основном связан с окислением из-за образования свободных гидроксильных радикалов (-OH). На самом деле многие грибы белой и бурой гнилей продуцируют перекись водорода (H₂O₂), которая вступает в реакцию Фентона, что приводит к образованию -OH. Эти свободные радикалы атакуют полисахариды, а также лигнин в клеточных стенках растений неспецифическим способом, обеспечивая частичное расщепление, что делает их более доступными для проникновения лигноцеллюлолитических ферментов [7].

Твердофазная ферментация. Традиционный способ применения твердофазной ферментации (SSF) – это получение продуктов вторичного метаболизма (антибиотики, алкалоиды, гормоны роста и т.д.), ферментов и т.д. Основными факторами, оказывающими влияние на эффективность ТФФ, являются такие свойства субстрата, как размер частиц, их форма и пористость, а также массопередача, температура, уровень кислотности и влагосодержание среды. Влагосодержание – критический фактор процесса ТФФ, который имеет влияние на рост и биосинтез метаболитов. Оптимальный уровень влажности субстрата колеблется между 30 и 75 % [31]. В условиях процесса SSF температура, pH и влажность являются жизненно важными факторами, влияющими на рост микроорганизмов и продукцию ими целлюлазы [6].

Ранее была показана принципиальная возможность получения в условиях ТФФ белково-углеводных кормовых добавок в рационы жвачных животных на основе конвейерной опилок съедобными дереворазрушающими базидиомицетами *Panus tigrinus*, *Pleurotus ostreatus*, *Coriolus hirsutus*. При ТФФ вышеуказанных макромицетов на древесных опилках отмечены самые высокие уровни активности целлюлаз по сравнению с активностью при поверхностном или глубинном культивировании этих грибов [32, 33].

SSF – одна из важных стратегий, используемых в промышленности для увеличения производства различных ферментов. В последние годы SSF набирает больше интереса в качестве подходящей стратегии для переработки богатых питательными веществами отходов, таких как лигноцеллюлозы. SSF облегчает не только возможности для биоконверсии агроотходов в продукты с добавленной стоимостью, но также она позволяет проводить эффективную переработку лигноцеллюлозных материалов с меньшим расходом энергии [34]. Ранее считали, что SSF подходит только для ферментации пищи или пищевых продуктов; но дальнейшие исследования показали несколько преимуществ этой технологии; такие как высокий выход фермента при низких затратах, использование

сельскохозяйственных отходов в качестве субстрата и более широкий спектр дополнительных ферментативных активностей, чем при глубокой ферментации (SmF). Таким образом, SSF является привлекательным способом для получения целлюлазы по экономическим причинам, из-за меньших капиталовложений и меньшей стоимости [6].

Глубинная ферментация. Глубинная ферментация (SmF) – наиболее часто используемая технология для крупномасштабного производства ферментов [3, 6]. Этот метод культивирования исходно был предложен и интенсивно применялся для получения пенициллина и других антибиотиков [35]. Легкость в управлении параметрами процесса (рН, температура, концентрация субстрата, индуктор, состав среды и др.) и мониторинг делают SmF привлекательным способом культивирования продуцентов целлюлаз. Среди микроорганизмов для получения ферментов, в том числе и целлюлаз, с помощью SmF используются как бактерии, так грибы, как, например, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* и др. [3, 6].

Целлюлолитическая активность грибов может варьировать в зависимости от состава среды, а также от условий культивирования. Следовательно, выбор подходящих стратегий ферментации является ключевым фактором для принятия решения об эффективности гриба с точки зрения продукции целлюлазы. Чтобы получить лучшую производительность, в SmF используются различные синтетические или природные источники углерода. Например, изучали продукцию целлюлазы *A. niger* на предварительно обработанных (щелочами) опилках, и максимальная целлюлазная активность наблюдалась при оптимизированном условии, т.е. рН между 4 и 4,5, 120 об/мин, при 28 °С и пептоне в качестве источника азота. Точно так же исследовали продуцирование целлюлазы штаммом *Penicillium* К-Р в жидкой среде путем добавления различных источников углерода и азота при различных значениях рН и температуры; гриб показал максимальную целлюлазную активность в присутствии фруктозы, нитрата аммония (аммиачной селитры), рН 3.0 и +30 °С на пятый день. Продукция целлюлаз изучена у *A. niger* в присутствии разных источников углерода и азота при различных значениях рН; и обнаружили, что максимальная продукция целлюлазы была на среде Чапека-Докса с добавлением 1 % карбоксиметил целлюлозы (далее – КМЦ) или опилок при рН 5, т.е. продукция целлюлазы в основном наблюдается при кислом рН и +20 ... +30 °С; в дополнение к способности грибов утилизировать источники углерода и азота, присутствующими в жидкой среде [6].

Исследованы особенности продуцирования целлюлаз культурами *Trichoderma viride* штамм 44 и *T. viride* штамм 13/10 в процессе их глубокого культивирования на среде Чапека после длительного (25 лет) хранения штаммов в коллекции. Показано, что наиболее активным ростом в среде Чапека с лактозой и микрокристаллической целлюлозой (далее – МКЦ) обладает штамм 13/10, продуцирующий больше целлюлаз по сравнению со штаммом 44. При росте на 3 %-ной лактозе и 1 %-ной МКЦ общая целлюлаз-

ная активность по осахариванию фильтровальной бумаги (далее – АФБ) штамма 13/10 составляет соответственно 1.9–2.3 и 0.14–0.17 ед/мл. Ниже уровень АФБ у штамма 44. В процессе роста штаммов карбоксиметилцеллюлазная активность (КМЦ-аза) увеличивается, и наибольшая активность фермента обнаруживается у штамма 13/10 как на 3 %-ной лактозе (7.2 ед/мл), так и на 1 %-ной МКЦ (6.5 ед/мл). КМЦ-азная активность штамма 44 при росте на обоих источниках углерода существенно ниже и не превышает 1.7 ед/мл при росте на 3 %-ной лактозе [3].

Исследованы особенности продуцирования КМЦ-азы двумя промышленными штаммами аскомицетного гриба *Trichoderma viride*: *T. viride* 44 (*T. viride* ВКПМ F-105) и *T. viride* 13/10 (*T. viride* ВКПМ F-120), в процессе их роста в среде Чапека с разными источниками углерода и индукторами биосинтеза целлюлаз. Источниками углерода и индукторами служили лактоза (1 %), целлобиоза (1 %), карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ, 1 %), микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ, 1 %), стебли серпухи (1 %), стебли кипрея (1 %). Также в составе среды Чапека использовали двухкомпонентный источник углерода: солодовые ростки (0.5 %) + овсяная мука (0.5 %). Наибольшая активность КМЦ-азы обнаруживается при росте штамма 44 в среде с лактозой, через 14 суток роста она составляет 2.5 ед/мл. При росте культуры в среде с тремя другими источниками углерода (целлобиоза, КМЦ, МКЦ) активность КМЦ-азы ниже 1 ед/мл. В среде с глюкозой КМЦ-азная активность в культуральных жидкостях не определяется. На всех испытанных растительных субстратах (серпуха, кипрей, солодовые ростки + овсяная мука) активность КМЦ-азы низкая и не превышает 1 ед/мл. Наибольшая активность КМЦ-азы обнаруживается при росте штамма 13/10 в среде с лактозой, через 14 суток роста активность составляет 5.4 ед/мл. При росте штамма 13/10 в среде с тремя другими источниками углерода (целлобиоза, КМЦ, МКЦ) активность КМЦ-азы ниже 1 ед/мл. При культивировании штамма 13/10 в среде с различными растительными субстратами высокий уровень КМЦ-азной активности обнаруживается в среде Чапека с двухкомпонентным источником углерода – солодовые ростки (0.5 %) + овсяная мука (0.5 %) и варьирует от 6.2 до 7.9 ед/мл. В среде Чапека с серпухой или кипреем активность КМЦ-азы низкая и не превышает 1 ед/мл [36].

Получение топливного этанола. Топливный биоэтанол получают из сахаристого сырья (сахарный тростник, сахарная свекла); крахмалистого сырья (пшеница, кукуруза, рис, картофель); целлюлозного сырья (опилки, солома, макулатура, энергетическая древесина); водорослевого сырья (ламинария, фукус); отходов промышленности (меласса, сульфитные щелока). Сырьевая база зависит от региона. Так, в Бразилии этанол производится из сахарного тростника, что обеспечивает наиболее низкую себестоимость, в США – из кукурузного крахмала, в Европе – из сахарной свеклы, картофельного и пшеничного крахмалов. По производству крахмалистого сырья (как и продукции сельскохозяйственного производства) лидерство США, очевидно, обусловлено в силу климатических условий.

Однако сырьевая база, способная многократно перекрыть потребности страны, не затрагивая сельскохозяйственных земель, есть фактически у каждого государства. При этом лигноцеллюлоза (отходы сельского хозяйства и переработки древесины) даже при самом высоком уровне развития технологий ее переработки будет иметь фундаментальный недостаток – образование твердых отходов лигнина. Водоросли обладают огромной зольностью – фактически вместо лигнина твердым отходом являются минеральные вещества. Да и технологии переработки этих субстратов весьма сложны, и крахмал с сахарным тростником являются лидерами по количеству производимого биоэтанола [2].

Биоэтанол известен как наиболее широко используемое биотопливо в транспортном секторе, и он имеет длительную историю в качестве альтернативного вида топлива. В 1984 г. Германия и Франция начали использовать биоэтанол в качестве топлива для двигателей внутреннего сгорания. Получение биоэтанола в Бразилии было начато с 1925 г., Европе и США – с начала 1900-х гг. После Второй мировой войны использованием биоэтанола пренебрегли из-за высокой стоимости его производства по сравнению с нефтяным топливом вплоть до нефтяного кризиса 1970-х гг. Интерес к биоэтанолю начал расти с 1980-х гг., и он стал считаться альтернативным топливом во многих странах. Глобальное производство этанола увеличилось с 13.12 млрд галлонов в 2007 г. до 25.68 млрд галлонов в 2015 г. с небольшим снижением в 2012 и 2013 гг. Соединенные Штаты Америки являются крупнейшим производителем этанола с объемом почти 15 млрд галлонов в 2015 г. Производство этанола Соединенными Штатами и Бразилией обеспечивает 85 % мирового производства [37].

Технология получения биоэтанола состоит из трех блоков – гидролиз сырья (целлюлозы, крахмала), собственно сбраживание и ректификация. Производство топливного этанола отличается от производства питьевого этанола важной деталью – наличием еще одной стадии – обезвоживания (абсолютирования) этанола. Получение абсолютированного этанола является важнейшим и общим этапом производства – этиловый спирт при перегонке под атмосферным давлением образует азеотропную смесь с водой, которая с бензином не смешивается. Кроме того, спирт гигроскопичен и чем больше в нем воды, тем лучше расслаивается смесь спирт – вода. Получается ситуация, при которой вначале из бензобака будет поступать один компонент топлива, а потом – второй. Для смешения с бензином необходим продукт с концентрацией этанола 99.5 % и более по объему. Наиболее технологически сложен процесс получения топливного этанола из гидролизатов древесины. Его можно реализовать только в крупном масштабе с использованием металлоемкого, коррозионностойкого оборудования, работающего под давлением. С точки зрения энергетической эффективности (отношение энергии, которую можно получить, сжигая имеющееся топливо, к энергии, потраченной на его производство) указанная технология наименее эффективна, поэтому основной тренд развития

исследований в области целлюлозного этанола – технологии ферментативного гидролиза [2, 38].

Биоконверсия лигноцеллюлозы в ценные вещества, такие как этанол, более сложна, чем биоконверсия крахмала, и, следовательно, требует четырех этапов обработки, из которых первые три являются биологическими процессами, и четвертый – это, в первую очередь, процесс химической инженерии: 1) предварительная обработка, 2) деполимеризация (осахаривание) целлюлозы и гемицеллюлоз до растворимых мономерных сахаров (гексозы и пентозы) с помощью процесса гидролиза, 3) конверсия этих мономерных сахаров в ценные продукты, такие как этанол в процессе ферментации и 4) разделение и очистка продуктов [7].

Основной проблемой в конверсии биомассы в биоэтанол является достижение выходов, которые делают его конкурентоспособным по стоимости с ископаемыми видами топлива. Целлюлоза в растительной клеточной стенке не легко доступна для ферментативного гидролиза целлюлазами, так как присутствие лигнина и гемицеллюлоз на поверхности целлюлозы мешает доступу целлюлаз к субстрату. Таким образом, предварительная обработка лигноцеллюлозных материалов перед ферментативным гидролизом является обязательным условием, и она может быть проведена разными методами [39].

Методы предварительной обработки могут быть разделены на три большие группы: химические (например, обработка кислотой или щелочью), физические/физико-химические (например, физическое измельчение шарами или физико-химический паровой взрыв) и биологическая предварительная обработка микроорганизмами [40].

После предварительной обработки целлюлоза и гемицеллюлозы гидролизуются до растворимых мономерных сахаров (гексоз и пентоз) с использованием целлюлаз и гемицеллюлаз соответственно. Некоторые штаммы грибов, как, например, *Trametes emersonii*, *T. aurantiacus*, *T. terrestris*, *Chaetomium thermophilum*, *Corynascus thermophilus* и др. могут продуцировать термостабильные ферменты, которые являются стабильными и активными при повышенных температурах (выше +60 °C), что значительно выше их оптимальной температуры роста (от +30 до +55 °C). Благодаря многообещающей термостабильности и кислотной толерантности термофильных грибных ферментов, они имеют хороший потенциал для гидролиза лигноцеллюлозных отходов в промышленных масштабах [7].

В процессе ферментации продукты гидролиза, включая мономерные гексозы (глюкоза, манноза и галактоза) и пентозы (ксилоза и арабиноза) будут сбраживаться до ценных продуктов, таких как этанол. Ферментация сбраживаемых сахаров в этанол осуществляется с помощью различных микроорганизмов, таких как *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipoides*, *Scheffersomyces condition*, *Zymomonas mobilis*, *Pachysolen tannophilus*, *Candida brassicae*, *Candida glabrata*, *Candida shehate*, *Candida tropicalis*, *Pichia stipitis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Mucor indicus* и т. д. [41].

Saccharomyces cerevisiae является наиболее часто и традиционно используемым микроорганизмом для сбраживания этанола из отходов на основе крахмала в промышленных масштабах [42]. Однако *S. cerevisiae* не может эффективно использовать ксилозу или арабинозу в качестве единственного источника углерода или сбраживать их до этанола. Чтобы сделать промышленную биоконверсию лигноцеллюлозы более экономически целесообразной, необходимо выбрать микроорганизмы, способные ферментировать как глюкозу, так и ксилозу и арабинозу. Для этого создают рекомбинантные штаммы дрожжей *S. cerevisiae*, несущие также гены, ферментирующие ксилозу и арабинозу [43, 44].

Показано, что некоторые соединения приводят к повышению продуктивности спиртового брожения: ненасыщенные жирные кислоты и стеролы, белки, аминокислоты, витамины и ионы металлов. Сложные среды, такие как сок топинамбура или комплексные добавки, такие как соевая мука и пептон, как было обнаружено, приводят к улучшению спиртового брожения путем увеличения толерантности к этанолу у дрожжей. Вероятно, что добавки, такие как оризенин, альбумин и мицелий плесени коджи могут действовать аналогичным образом [45].

Для оптимального роста и ферментации дрожжам требуются микро- и миллимолярные концентрации различных неорганических катионов. Эти катионы могут либо воздействовать на ферментативную активность путем воздействия на каталитический центр, или в качестве активаторов или стабилизаторов, или они могут играть структурную роль путем защиты отрицательно заряженных мембранных фосфолипидов и фосфоманнанов клеточной стенки. Для нескольких видов рода *Saccharomyces* были определены оптимальные концентрации различных катионов [46].

Дополнение дрожжевых ферментаций 0.5 мМ Mg²⁺, катиона, который требуется для нуклеотидных кофакторов гликолитических ферментов, обеспечило продление экспоненциального роста и уменьшило снижение ферментативной активности [47]. Клетки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* и *Kluyveromyces marxianus*, выращиваемые и инкубируемые в среде с оптимальной концентрацией Ca²⁺ (0.75 мМ), демонстрируют более высокую толерантность к этанолу. Однако оптимизация концентрации Ca²⁺ (или любого другого иона) в сложных промышленных ферментационных средах может быть затруднена. На самом деле промышленные среды содержат ряд хелатирующих, секвестрирующих и адсорбирующих ингредиентов (аминокислоты, белки, органические кислоты, полифенолы, полифосфаты и др.), снижающих концентрацию ионов [45].

В течение 1990-х гг. во многих лабораториях мира исследовали возможность получения этанола непосредственно из лигноцеллюлозных материалов с использованием анаэробных термофильных микроорганизмов, из них бактерия *Clostridium thermocellum* является наиболее изученной. Большое преимущество использования этих бактерий в том, что они гидролизуют целлюлозу и в одно и

то же время ферментируют полученные сахара непосредственно в этиловый спирт. Целлюлосома *C. thermocellum* содержит различные типы гликозилгидролаз, включая целлюлазы и гемицеллюлазы, связанные с основным полипептидом, называемым скаффолдином, или CipA [8].

Заключение

Большой спрос на натуральные продукты повысил значение промышленных ферментов, среди них целлюлазы занимают одно из центральных мест. Основным узким местом в коммерциализации целлюлазы является недостаток экономически целесообразных процессов биоконверсии лигноцеллюлозы, и в соответствии со спросом работа над улучшением функционирования/катализа целлюлазы должна продолжаться. Поиск подходящих субстратов, микроорганизмов и ферментационных стратегий должен продолжаться так, чтобы достичь более высокой производительности, качества и экономической целесообразности процессов биоконверсии лигноцеллюлозы. Более того, дальнейшие исследования целлюлазы должны быть расширены с помощью генной/белковой инженерии для эффективной утилизации целлюлозной биомассы, способствуя появлению более эффективных методов и способов биоконверсии лигноцеллюлозных отходов.

Литература

1. Селиванов, А. С. Стабильность ферментных препаратов в условиях, моделирующих распылительную сушку / А. С. Селиванов // Химия растительного сырья. – 2002. – № 2. – С. 121–127.
2. Биотехнологический потенциал дереворазрушающих грибов для получения биотоплива / В. В. Володин, Н. Н. Шергина, В. В. Мартынов [и др.] // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. – 2021. – Т. 17, № 4. – С. 11–23.
3. Продуцирование целлюлаз аскомицетным грибом *Trichoderma viride* после длительного хранения в кол-лекции / А. А. Шубаков, С. О. Володина, В.В. Мартынов [и др.] // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. – 2021. – Т. 17, № 4. – С. 48–54.
4. Ферментативный гидролиз порошковых целлюлоз, полученных различными методами / М. А. Торлопов, Д. В. Тарабукин, С. В. Фролова [и др.] // Химия растительного сырья. – 2007. – № 3. – С. 69–76.
5. Кинетика ферментативного гидролиза лигноцеллюлозных материалов при различных концентрациях субстрата / В. В. Будаева, Е. А. Скиба, О. В. Байбакова [и др.] // Катализ в промышленности. – 2015. – Т. 15, № 5. – С. 60–66.
6. An overview on fungal cellulases with an industrial perspective / S. Sajth, P. Priji, S. Sreedevi [et al.] // J. Nutr. Food Sci. – 2016. – Vol. 6, N 1. – P. 1–13.
7. Dashtban, M. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; Opportunities and Perspectives / M. Dashtban, H. Schraft, W. Qin // Int. J. Biol. Sci. – 2009. – Vol. 5, N 6. – P. 578–595.

8. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview / J. Perez, J. Muñoz-Dorado, T. de la Rubia [et al.] // *Int. Microbiol.* – 2002. – Vol. 5. – P. 53–63.
9. Plant cell walls to ethanol / D. B. Jordan, M. J. Bowman, J. D. Braker [et al.] // *Biochem. J.* – 2012. – N 442. – P. 241–252.
10. Грачева, И. М. Технология ферментных препаратов / И. М. Грачева, А. Ю. Крявова. – Москва : Элевар, 2000. – 512 с.
11. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production / R. K. Sukumaran, R. R. Singhanian, G. M. Mathew [et al.] // *Renew. Energy.* – 2009. – Vol. 34, N 2. – P. 421–424.
12. Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass / B. Yang, Z. Dai, S.-Y. Ding [et al.] // *Biofuels.* – 2011. – Vol. 2, N 4. – P. 421–450.
13. Mandels, M. Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals / M. Mandels, E. T. Reese // *J. Bacteriol.* – 1957. – Vol. 73, N 2. – P. 269–278.
14. Cellulase production by continuous culture of *Trichoderma reesei* Rut C30 using acid hydrolysate prepared to retain more oligosaccharides for induction / C.-M. Lo, Q. Zhang, N. V. Callow [et al.] // *Bioresour. Technol.* – 2010. – Vol. 101, N 2. – P. 717–723.
15. Regulation and improvement of cellulase production: Recent advances / N. Ali, M. A. Athar, Y. H. Khan [et al.] // *Nat. Res.* – 2014. – Vol. 5. – P. 857–863.
16. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics / B. L. Cantarel, P. M. Coutinho, C. Rancurello [et al.] // *Nucl. Acids Res.* – 2009. – Vol. 37. – P. 233–238.
17. Hildén, L. Recent developments on cellulases and carbohydrate-binding modules with cellulose affinity / L. Hildén, G. Johansson // *Biotechnol. Lett.* – 2004. – Vol. 26. – P. 1683–1693.
18. Fungal cellulases / C. M. Payne, B. C. Knott, H. B. Mayes [et al.] // *Chem. Rev.* – 2015. – Vol. 115. – P. 1308–1448.
19. Клесов, А. А. Ферментативный гидролиз целлюлозы III. Закономерности образования глюкозы и целлобиозы при действии полиферментных целлюлазных систем на нерастворимую (природную) целлюлозу / А. А. Клесов, С. Ю. Григораш // *Биоорганическая химия.* – 1981. – Т. 7, № 10. – С. 1538–1552.
20. Purification and properties of endoglucanase from a sugar cane bagasse hydrolyzing strain, *Aspergillus glaucus* XC9 / Y. M. Tao, X. Z. Zhu, J. Z. Huang [et al.] // *J. Agric. Food Chem.* – 2010. – Vol. 58, N 10. – P. 6126–6130.
21. Purification and characterization of an endoglucanase from *Aspergillus terreus* highly active against barley β -glucan and xyloglucan / A. Nazir, R. Soni, H. Saini [et al.] // *World J. Microbiol. Biotechnol.* – 2009. – Vol. 25, N 7. – P. 1189–1197.
22. Purification and characterization of a thermostable intra-cellular β -glucosidase with transglycosylation properties from filamentous fungus *Termitomyces clypeatus* / S. Pal, S. P. Banik, S. Ghorai [et al.] // *Bioresour. Technol.* – 2010. – Vol. 101. – P. 2412–2420.
23. Parry, J. B. Purification of the major endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* Fresenius / J. B. Parry, J. C. Stewart, J. Heptinstall // *Biochem. J.* – 1983. – Vol. 213. – P. 437–444.
24. Purification and characterization of two low molecular weight endoglucanases produced by *Penicillium occitanis* mutant Pol 6 / S. E. Chaabouni, T. Mechichi, F. Limam [et al.] // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2005. – Vol. 125. – P. 99–112.
25. Naika, G. S. Purification and characterization of a new endoglucanase from *Aspergillus aculeatus* / G. S. Naika, P. Kaul, V. Prakash // *J. Agric. Food Chem.* – 2007. – Vol. 55. – P. 7566–7572.
26. Metabolic engineering strategies for the improvement of cellulase production by *Hypocrea jecorina* / C. P. Kubicek, M. Mikus, A. Schuster [et al.] // *Biotechnol. Biofuels.* – 2009. – Vol. 2. – Article 19.
27. Shallom, D. Microbial hemicellulases / D. Shallom, Y. Shoham // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2003. – Vol. 6. – P. 219–228.
28. Biodegradation of lignocelluloses: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin / A. T. Martinez, M. Speranza, F. J. Ruiz-Duenas [et al.] // *Int. Microbiol.* – 2005. – Vol. 8. – P. 195–204.
29. Arora, D. S. Ligninolytic fungal laccases and their biotechnological applications / D. S. Arora R. K. Sharma // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2010. – Vol. 160. – P. 1760–1788.
30. Wong, D. W. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes / D. W. Wong // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2009. – Vol. 157. – P. 174–209.
31. Смирнов, К. А. Особенности твердофазной ферментации / К. А. Смирнов, Ю. Д. Алашкевич, Н. С. Решетова // *Химия растительного сырья.* – 2009. – № 3. – С. 161–164.
32. Ануфриева, Э. Н. Конверсия опилок в белково-углеводные кормовые препараты в процессе твердофазной ферментации высшими грибами / Э. Н. Ануфриева // *Биоконверсия целлюлозосодержащего сырья.* – Сыктывкар, 1992. – С. 51–59. – (Тр. Коми НЦ УрО РАН, № 125).
33. Ануфриева, Э. Н. Влияние условий культивирования на продуцирование лигноцеллюлазного комплекса дереворазрушающими базидиомицетами / Э. Н. Ануфриева, И. Н. Алексеев, Н. Н. Шергина // *Биоконверсия целлюлозосодержащего сырья.* – Сыктывкар, 1992. – С. 60–70. – (Тр. Коми НЦ УрО РАН, № 125).
34. Pandey, A. Solid-state fermentation / A. Pandey // *Biochem. Eng. J.* – 2003. – Vol. 13. – P. 81–84.
35. Underkofler, L. A. Production of microbial enzymes and their applications / L. A. Underkofler, R. R. Barton, S. S. Rennert // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1958. – Vol. 6, N 3. – P. 212–221.
36. Карбоксиметилцеллюлазная активность аскомицетного гриба *Trichoderma viride* / А. А. Шубаков, Е. А. Михайлова, С. О. Володина [и др.] // *Бутлеровские сообщения.* – 2022. – Т. 70, №5. – С.107–113.

37. Yeasts in sustainable bioethanol production: A review / S. H. M. Azhar, R. Abdulla, S. A. Jambo [et al.] // *Biochem. Biophys. Rep.* – 2017. – Vol. 10. – P. 52–61.
38. Гарабаджиу, А. Перспективы индустрии биотоплива в России / А. Гарабаджиу, Г. Козлов, В. Галынкин // *Энергетика и промышленность России.* – 2014. – № 10 (246).
39. Fractionating recalcitrant lignocellulose at modest reaction conditions / Y. H. Zhang, S. Y. Ding, J. R. Mielenz [et al.] // *Biotechnol. Bioeng.* – 2007. – Vol. 97. – P. 214–223.
40. Taherzadeh, M. J. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review / M. J. Taherzadeh, K. Karimi // *Int. J. Mol. Sci.* – 2008. – Vol. 9. – P. 1621–1651.
41. Kumar, A. Biotechnological transformation of lignocellulosic biomass in to industrial products: An Overview / A. Kumar, A. Gautam, D. Dutt // *Adv. Biosci. Biotechnol.* – 2016. – Vol. 7. – P. 149–168.
42. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today / B. Hahn-Hagerdal, M. Galbe, M. F. Gorwa-Grauslund [et al.] // *Trends Biotechnol.* – 2006. – Vol. 24. – P. 549–556.
43. McMillan, J. D. Arbinose utilization by xylose-fermenting yeasts and fungi / J. D. McMillan, B. L. Boynton // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 1994. – Vol. 45. – P. 569–584.
44. Chu, B. C. Genetic improvement of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose fermentation / B. C. Chu, H. Lee // *Biotechnol. Adv.* – 2007. – Vol. 25. – P. 425–441.
45. Influence of calcium ion on ethanol tolerance of *Saccharomyces bayanus* and alcoholic fermentation by yeasts / R. C. Nabais, I. Sa-Correira, C. A. Viegas [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1988. – Vol. 54, N 10. – P. 2439–2446.
46. Jones, R. P. A review of yeast ionic nutrition: growth and fermentation requirements / R. P. Jones, P. F. Greenfield // *Process Biochem.* – 1984. – Vol. 19. – P. 48–60.
47. Dombek, K. M. Magnesium limitation and its role in apparent toxicity of ethanol during yeast fermentation / K. M. Dombek, L. O. Ingram // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1986. – Vol. 52. – P. 975–981.
- collection] / A. A. Shubakov, S. O. Volodina, V. V. Martynov [et al.] // *Vestnik biotekhnologii i fiziko-himicheskoy biologii im. YU.A. Ovchinnikova.* [Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov]. – 2021. – Vol. 17, N 4. – P. 48–54.
4. Fermentativnyj gidroliz poroshkovykh cellyuloz, poluchennykh razlichnymi metodami [Enzymatic hydrolysis of powdered celluloses obtained by various methods] / M. A. Torlopov, D. V. Tarabukin, S. V. Frolova [et al.] // *Himiya rastitel'nogo syr'ya.* [Chemistry of plant raw material]. – 2007. – N 3. – P. 69–76.
5. Kinetika fermentativnogo gidroliza lignocellyuloznykh materialov pri razlichnykh koncentraciyah substrata [Kinetics of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials at various substrate concentrations] / V. V. Budaeva, E. A. Skiba, O. V. Baibakova [et al.] // *Kataliz v promyshlennosti.* [Catalysis in industry]. – 2015. – Vol. 15, N 5. – P. 60–66.
6. An overview on fungal cellulases with an industrial perspective / S. Sajth, P. Priji, S. Sreedevi [et al.] // *J. Nutr. Food Sci.* – 2016. – Vol. 6, N 1. – P. 1–13.
7. Dashtban, M. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; Opportunities and Perspectives / M. Dashtban, H. Schraft, W. Qin // *Int. J. Biol. Sci.* – 2009. – Vol. 5, N 6. – P. 578–595.
8. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview / J. Perez, J. Munoz-Dorado, T. de la Rubia [et al.] // *Int. Microbiol.* – 2002. – Vol. 5. – P. 53–63.
9. Plant cell walls to ethanol / D. B. Jordan, M. J. Bowman, J. D. Braker [et al.] // *Biochem. J.* – 2012. – N 442. – P. 241–252.
10. Gracheva, I. M. Tekhnologiya fermentnykh preparatov [Technology of enzyme preparations] / I. M. Gracheva, A. Yu. Kryavova. – Moscow : Elevar, 2000. – 512 p.
11. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production / R. K. Sukumaran, R. R. Singhanian, G. M. Mathew [et al.] // *Renew. Energy.* – 2009. – Vol. 34, N 2. – P. 421–424.
12. Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass / B. Yang, Z. Dai, S.-Y. Ding [et al.] // *Biofuels.* – 2011. – Vol. 2, N 4. – P. 421–450.
13. Mandels, M. Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals / M. Mandels, E. T. Reese // *J. Bacteriol.* – 1957. – Vol. 73, N 2. – P. 269–278.
14. Cellulase production by continuous culture of *Trichoderma reesei* Rut C30 using acid hydrolysate prepared to retain more oligosaccharides for induction / C.-M. Lo, Q. Zhang, N. V. Callow [et al.] // *Bioresour. Technol.* – 2010. – Vol. 101, N 2. – P. 717–723.
15. Regulation and improvement of cellulase production: Recent advances / N. Ali, M. A. Athar, Y. H. Khan [et al.] // *Nat. Res.* – 2014. – Vol. 5. – P. 857–863.
16. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics / B. L. Cantarel, P. M.

References

1. Selivanov, A. S. Stabil'nost' fermentnykh preparatov v usloviyah, modeliruyushchih raspylitel'nyuyu sushku [Stability of enzyme preparations under conditions simulating spray drying] // *Himiya rastitel'nogo syr'ya.* [Chemistry of plant raw material]. – 2002. – № 2. – P. 121–127.
2. Biotekhnologicheskij potencial derevorazrushayushchih gribov dlya polucheniya biotopliva [Biotechnological potential of wood-destroying fungi for biofuel production] / V. V. Volodin, N. N. Shergina, V. V. Martynov [et al.] // *Vestnik biotekhnologii i fiziko-himicheskoy biologii im. YU.A. Ovchinnikova.* [Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov]. – 2021. – Vol. 17, N 4. – P. 11–23.
3. Producirovaniye cellyulaz askomicetnym gribom *Trichoderma viride* posle dlitel'nogo hraneniya v kollekcii [Comparative study of cellulase activity of two production strains of *Trichoderma viride* after long-term storage in

- Coutinho, C. Rancurelom [et al.] // Nucl. Acids Res. – 2009. – Vol. 37. – P. 233–238.
17. Hildén, L. Recent developments on cellulases and carbohydrate-binding modules with cellulose affinity / L. Hildén, G. Johansson // Biotechnol. Lett. – 2004. – Vol. 26. – P. 1683–1693.
 18. Fungal cellulases / C. M. Payne, B. C. Knott, H. B. Mayes [et al.] // Chem. Rev. – 2015. – Vol. 115. – P. 1308–1448.
 19. Klesov, A. A. Fermentativnyj gidroliz celljulozy III. Zakonomernosti obrazovaniya gljukozy i cellobiozy pri dejstvii polifermentnyh celljulaznyh sistem na nerastvorimuju (prirodnuju) celljulozu [Enzymatic hydrolysis of cellulose III. Regularities of the formation of glucose and cellobiose under the action of polyezyme cellulase systems on insoluble (natural) cellulose] / A. A. Klesov, S. Yu. Grigorash // Bioorg. himija. [Bioorg. chemistry.] – 1981. – Vol. 7, N 10. – P. 1538–1552.
 20. Purification and properties of endoglucanase from a sugar cane bagasse hydrolyzing strain, *Aspergillus glaucus* XC9 / Y. M. Tao, X. Z. Zhu, J. Z. Huang [et al.] // J. Agric. Food Chem. – 2010. – Vol. 58, N 10. – P. 6126–6130.
 21. Purification and characterization of an endoglucanase from *Aspergillus terreus* highly active against barley β -glucan and xyloglucan / A. Nazir, R. Soni, H. Saini [et al.] // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2009. – Vol. 25, N 7. – P. 1189–1197.
 22. Purification and characterization of a thermostable intracellular β -glucosidase with transglycosylation properties from filamentous fungus *Termitomyces clypeatus* / S. Pal, S. P. Banik, S. Ghorai [et al.] // Bioresour. Technol. – 2010. – Vol. 101. – P. 2412–2420.
 23. Parry, J. B. Purification of the major endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* Fresenius / J. B. Parry, J. C. Stewart, J. Heptinstall // Biochem. J. – 1983. – Vol. 213. – P. 437–444.
 24. Purification and characterization of two low molecular weight endoglucanases produced by *Penicillium occitanis* mutant Pol 6 / S. E. Chaabouni, T. Mechichi, F. Limam [et al.] // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2005. – Vol. 125. – P. 99–112.
 25. Naika, G. S. Purification and characterization of a new endoglucanase from *Aspergillus aculeatus* / G. S. Naika, P. Kaul, V. Prakash // J. Agric. Food Chem. – 2007. – Vol. 55. – P. 7566–7572.
 26. Metabolic engineering strategies for the improvement of cellulase production by *Hypocrea jecorina* / C. P. Kubicek, M. Mikus, A. Schuster [et al.] // Biotechnol. Biofuels. – 2009. – Vol. 2. – Article 19.
 27. Shallom, D. Microbial hemicellulases / D. Shallom, Y. Shoham // Curr. Opin. Microbiol. – 2003. – Vol. 6. – P. 219–228.
 28. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin / A. T. Martinez, M. Speranza, F. J. Ruiz-Duenas [et al.] // Int. Microbiol. – 2005. – Vol. 8. – P. 195–204.
 29. Arora, D. S. Ligninolytic fungal laccases and their biotechnological applications / D. S. Arora R. K. Sharma // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2010. – Vol. 160. – P. 1760–1788.
 30. Wong, D. W. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes / D. W. Wong // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2009. – Vol. 157. – P. 174–209.
 31. Smirnov, K. A. Osobennosti tverdogaznoj fermentacii [Peculiarities of solid-phase fermentation] / K. A. Smirnov, Yu. D. Alashkevich, N. S. Reshetova // Himiya rastitel'nogo syr'ya. [Chemistry of plant raw material]. – 2009. – N 3. – P. 161–164.
 32. Anufrieva, E. N. Konversiya opilok v belkovo-uglevodnye kormovye preparaty v processe tverdogaznoj fermentacii vysshimi gribami [Conversion of sawdust into protein-carbohydrate feed preparations in the process of solid-phase fermentation by higher fungi] / E. N. Anufrieva // Biokonversiya cellyulozosoderzhashchego syr'ya. [Bioconversion of cellulose-containing raw materials]. – Syktyvkar, 1992. – P. 51–59. (Proceedings of the Komi Scientific Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, № 125).
 33. Anufrieva, E. N. Vliyanie uslovij kul'tivirovaniya na produkcirovanie lignocellyulaznogo kompleksa derevorazrushayushchimi bazidiomicetami [Influence of cultivation conditions on the production of lignocellulase complex by wood-destroying basidiomycetes] / E. N. Anufrieva, I. N. Alekseev, N. N. Shergina // Biokonversiya cellyulozosoderzhashchego syr'ya. [Bioconversion of cellulose-containing raw materials]. – Syktyvkar, 1992. – P. 60–70. (Proceedings of the Komi Scientific Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, № 125).
 34. Pandey, A. Solid-state fermentation / A. Pandey // Biochem. Eng. J. – 2003. – Vol. 13. – P. 81–84.
 35. Underkofler, L. A. Production of microbial enzymes and their applications / L. A. Underkofler, R. R. Barton, S. S. Rennert // Appl. Environ. Microbiol. – 1958. – Vol. 6, N 3. – P. 212–221.
 36. Karboksimetilcellyulaznaya aktivnost' askomicetnogo griba *Trichoderma viride* [Carboxymethylcellulase activity of the ascomycete fungus *Trichoderma viride*] / A. A. Shubakov, E. A. Mikhailova, S. O. Volodina [et al.] // Butlerovskie soobshcheniya. [Butlerov Communications]. – 2022. – Vol. 70, N 5. – P. 107–113.
 37. Yeasts in sustainable bioethanol production: A review / S. H. M. Azhar, R. Abdulla, S. A. Jambo [et al.] // Biochem. Biophys. Rep. – 2017. – Vol. 10. – P. 52–61.
 38. Garabadzhiu, A. Perspektivy industrii biotopliva v Rossii [Prospects for the biofuel industry in Russia] / A. Garabadzhiu, G. Kozlov, V. Galyntin // Gazeta «Energetika i promyshlennost' Rossii». [Energy and Industry of Russia newspaper]. – 2014. – N 10 (246).
 39. Fractionating recalcitrant lignocellulose at modest reaction conditions / Y. H. Zhang, S. Y. Ding, J. R. Mielenz [et al.] // Biotechnol. Bioeng. – 2007. – Vol. 97. – P. 214–223.
 40. Taherzadeh, M. J. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review / M. J. Taherzadeh, K. Karimi // Int. J. Mol. Sci. – 2008. – Vol. 9. – P. 1621–1651.
 41. Kumar, A. Biotechnological transformation of lignocellulosic biomass in to industrial products: An Overview /

- A. Kumar, A. Gautam, D. Dutt // *Adv. Biosci. Biotechnol.* – 2016. – Vol. 7. – P. 149–168.
42. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today / B. Hahn-Hagerdal, M. Galbe, M. F. Gorwa-Grauslund [et al.] // *Trends Biotechnol.* – 2006. – Vol. 24. – P. 549–556.
43. McMillan, J. D. Arbinose utilization by xylose-fermenting yeasts and fungi / J. D. McMillan, B. L. Boynton // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 1994. – Vol. 45. – P. 569–584.
44. Chu, B. C. Genetic improvement of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose fermentation / B. C. Chu, H. Lee // *Bio-technol. Adv.* – 2007. – Vol. 25. – P. 425–441.
45. Influence of calcium ion on ethanol tolerance of *Saccharomyces bayanus* and alcoholic fermentation by yeasts / R. C. Nabais, I. Sa-Correira, C. A. Viegas [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1988. – Vol. 54, N 10. – P. 2439–2446.
46. Jones, R. P. A review of yeast ionic nutrition: growth and fermentation requirements / R. P. Jones, P. F. Greenfield // *Process Biochem.* – 1984. – Vol. 19. – P. 48–60.
47. Dombek, K. M. Magnesium limitation and its role in apparent toxicity of ethanol during yeast fermentation / K. M. Dombek, L. O. Ingram // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1986. – Vol. 52. – P. 975–981.

Благодарность (госзадание)

Исследования проведены в рамках выполнения государственного задания по теме «Научно обоснованные биотехнологии для улучшения экологической обстановки и здоровья человека на Севере» № 1021051101411-4-1.6.23.

Информация об авторах:

Шубаков Анатолий Александрович – доцент, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биохимии и биотехнологии Института биологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН; Scopus Author ID: 6506594297, ORCID: 0000-0001-7705-016x (Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федеральный исследовательский центр «Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук»; Российская Федерация, 167982, Республика Коми, г. Сыктывкар, ул. Коммунистическая, д. 28; e-mail: shubakov@ib.komisc.ru; shubakov.anatol@mail.ru; тел.: (8212) 24-11-19; 89125670265).

Михайлова Елена Андреевна – младший научный сотрудник отдела молекулярной иммунологии и биотехнологии, группа биотехнологии Института физиологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН; Scopus Author ID: 57206659811, ORCID: 0000-0001-6490-9158 (Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федеральный исследовательский центр «Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук»; Российская Федерация, 167982, Республика Коми, г. Сыктывкар, ул. Первомайская, д. 50; e-mail: elena_elkina@mail.ru, тел./факс: (8212) 24-00-85).

Мартынов Владислав Владимирович – инженер, аспирант лаборатории биохимии и биотехнологии Института биологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН; Scopus Author ID: 57218542348, ORCID: 0000-0003-0806-9320 (Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федеральный исследовательский центр «Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук»; Российская Федерация, 167982, Республика Коми, г. Сыктывкар, ул. Коммунистическая, д. 28; e-mail: mar7inov.v@yandex.ru, тел.: (8212) 24-11-19; 89121473275).

About the authors:

Anatoly A. Shubakov – Candidate of Sciences (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Biochemistry and Biotechnology, Institute of Biology, Federal Research Centre Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences; Scopus Author ID 6506594297, <https://orcid.org/0000-0001-7705-016x> (Institute of Biology, Federal Research Centre Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 28, Kommunisticheskaya St., Syktyvkar, GSP-2, the Komi Republic, Russia, 167982; e-mail: shubakov@ib.komisc.ru; shubakov.anatol@mail.ru).

Elena A. Mikhailova – Junior Researcher, Department of Molecular Immunology and Biotechnology, Institute of Biology, Federal Research Center Komi Science Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences; Scopus Author ID 57206659811, <https://orcid.org/0000-0001-6490-9158> (Institute of Biology, Federal Research Centre Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 28, Kommunisticheskaya St., Syktyvkar, GSP-2, the Komi Republic, Russia, 167982; e-mail: elena_elkina@mail.ru).

Vladislav V. Martynov – Postgraduate, Engineer, Laboratory of Biochemistry and Biotechnology, Institute of Biology, Federal Research Centre Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences; Scopus Author ID 57218542348, <https://orcid.org/0000-0003-0806-9320> (Institute of Biology, Federal Research Centre Komi Science Centre of the Ural Branch

of the Russian Academy of Sciences, 28, Kommunisticheskaya St., Syktyvkar, GSP-2, the Komi Republic, Russia, 167982; e-mail: mar7inov.v@yandex.ru).

Для цитирования:

Шубаков, А. А. Биоконверсия целлюлозосодержащего сырья. Ферментативный гидролиз целлюлозы (обзор литературы) / А. А. Шубаков, Е. А. Михайлова, В. В. Мартынов // Известия Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук. Серия «Экспериментальная биология и экология». – 2022. – № 4 (56). – С. 27–38. УДК 577.15:579.8. DOI 10.19110/1994-5655-2022-4-27-38

For citation:

Shubakov, A.A. Biokonversija celljulozosoderzhashhego syr"ja. Fermentativnyj gidroliz celljulozy (obzor literatury) [Bioconversion of cellulose-containing raw material. Enzymatic hydrolysis of cellulose (review)] / A. A. Shubakov, E. A. Mikhailova, V. V. Martynov // Proceedings of the Komi Scientific Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences. Series "Experimental Biology and Ecology". – 2022. – № 4 (56). – P. 27–38. UDC 577.15:579.8. DOI 10.19110/1994-5655-2022-4-27-38

Дата поступления рукописи: 20.07.2022

Прошла рецензирование: –

Принято решение о публикации: 02.08.2022

Received: 20.07.2022

Reviewed: –

Accepted: 02.08.2022