

Введение Использование биомассы в качестве источника топлива датируется со времен так называемого «пекинского человека», 460 000 до 230 000 лет назад [1], это было одним из главных аспектов в эволюции человека как разумного существа [2]. Несмотря на то, что такая простая форма её использования в ходу и сегодня, пути переработки биомассы в топливо и химические продукты имеют важное значение для любой стратегии устойчивого развития энергетики и промышленности. Глобальный рост потребления энергии, истощение легкодоступных запасов ископаемого топлива и изменение климата требуют настоятельную необходимость производства топлива и химических веществ на основе возобновляемого сырья. Лигноцеллюлозная биомасса особенно привлекательна в качестве сырья для производства ценных продуктов из-за ее относительно низкой стоимости, большого изобилия и отработанной логистики [3]. Отходы сельского хозяйства, такие как жом сахарной свеклы, пшеничная и рисовая солома, стебли кукурузы, представляют собой идеальное сырье для биотехнологического производства продукции с высокой добавленной стоимостью. Состав возобновляемого растительного сырья Целлюлоза является наиболее распространенным биополимером на земле [4, 5]. Производство химических продуктов из лигноцеллюлозной биомассы стало одним из основных направлений интенсивных исследований и разработок в последние десятилетия [6]. Биомасса состоит в основном из целлюлозы, гемицеллюлозы, лигнина и белков (табл. 1). Лигноцеллюлозное сырье часто требует предварительной обработки для высвобождения сахаров из целлюлозных волокон, встроенных в гетероматрицы растительной клеточной стенки [7, 8]. Состав различных видов лигноцеллюлозы может значительно варьировать в зависимости от типа клеточной стенки и условий произрастания биомассы. Например, содержание глюкана, лигнина или ксилана в кукурузных стеблях разного урожая или разной территории может отличаться на 10% в абсолютных значениях из-за таких факторов, как год урожая и условия окружающей среды [9].

Таблица 1 - Состав клеточной стенки возобновляемого растительного сырья [9]

Биомасса	Лигнин, %	Гемицел-люлоза, %	Целлю-лоза, %	Другое, %
Пшеничная солома	8,3	28,2	43,7	19,8
Стебли кукурузы	13,6	26,3	43,3	16,7
Рисовая солома	25,0	25,0	38,0	12,0
Жом сахарного тростника	21,1	27,0	45,5	6,8
Листья сахарного тростника	18,0	25,0	45,0	12,0
Бамбук	28,1	24,6	46,7	0,6
Мискантус	7,6-11,5	23,5-33,8	41,2-52,9	27,7

Ресурсы лигноцеллюлозосодержащей биомассы Основными ресурсными источниками растительной биомассы являются древесина, отходы от ее заготовки и переработки, сельскохозяйственные отходы растениеводства, а также бытовые отходы. Отходы лесозаготовок составляют 40-60% от заготавливаемой древесины в России. До 20 % составляют отходы, образующиеся при лесопереработке, используемые пока только на 20%. На 1 м3 вывезенной из леса древесины приходится до 500 кг отходов биомассы в виде пней, ветвей, древесной зелени, некондиционной древесины [10, 11]. По

приблизенным оценкам, суммарное годовое количество отходов лесопромышленного комплекса составляет свыше 200 млн м³. Отходы сельскохозяйственного производства составляют 200-250 млн м³ в год. Твердые бытовые отходы ежегодно накапливаются в количестве 35 млн т. Рис 1 - Располагаемые (1), действительные (2) и экономически доступные (3) ресурсы древесной биомассы в РФ [10] В работе [12] был оценен объём генерации соломы и свекловичного жома в РФ. Российский агропромышленный комплекс ежегодно производит 773 млн. т отходов (260 млн. т по сухому веществу). Из них 220 млн. т (150 млн. т по сухому веществу) приходится на растениеводство и 30 млн. т (14 млн. т по сухому веществу) - на отходы перерабатывающей промышленности. Отходы сельского хозяйства составляют 100-150 % объемов урожаев полевых культур, таких как сахарная свекла, помидоры, картофель, соя, пшеница, рис и другие зерновые. При сборе урожая зерновых культур биологический выход его нетоварной части (соломы и половы) определяется произведением количества собранного зерна на множитель, который зависит от вида зерновой культуры: для озимой ржи -1,6-2,0; яровой пшеницы и овса - 1,3-1,5, ячменя - 1,2; кукурузы - 2,5; подсолнечника - 2,8). Так при сборе в 2012 году в Республике Татарстан 3,2 млн. т зерна на полях сельскохозяйственных предприятий образовалось в среднем 5,0 млн. т соломы. Средний выход сахара при переработке сахарной свеклы составляет 10-12%, при этом образуется 80-84 % сырого свекловичного жома [11]. Предварительная обработка и гидролиз биомассы Предварительная обработка - процесс, преобразующий любую лигноцеллюлозную биомассу из нативной формы, устойчивой к ферментному гидролизу, в форму, эффективную для ферментативного гидролиза [3]. Ключевым фактором в определении оптимального пути предобработки для каждого типа лигноцеллюлозной биомассы является относительное содержание целлюлозы, гемицеллюлозы и лигнина. Стойкость биомассы при переработке напрямую связана со свойствами конкретного сырья. Факторы, которые способствуют устойчивости биомассы включают [13]: - Кристалличность и степень полимеризации целлюлозы; - Площадь доступной поверхности (или пористость); - Степень «защиты» (экранирования) целлюлозы лигнином; - Степень оборачивания целлюлозы гемицеллюлозами; - Прочность волокна. Чем больше удалено лигнина из биомассы, тем более эффективен последующий ферментализм биомассы. Высококристаллическая целлюлоза является менее доступной для ферментализма, чем аморфная [14]. Доступность целлюлозы для ферментов является одним из наиболее важных ограничивающих факторов ферментативного гидролиза после минимизации влияния лигнина [15]. Существует несколько ключевых критериев эффективной предобработки. Процесс предобработки должен иметь низкие капитальные и эксплуатационные затраты. Он должен быть эффективным в широком диапазоне параметров и должен привести к выделению большинства компонентов сырья в виде

отдельных фракций. Должна быть минимизирована необходимость подготовки сырья, например уменьшение размера частиц. Предобработка не должна вести к получению продуктов распада сахаров и лигнина, которые ингибируют действие гидролитических ферментов и рост микроорганизмов, а также процесс не должен требовать много энергии или затраченная энергия должна использоваться далее в процессе [16]. Стоимость применяемого катализатора и возможность его регенерации, возможность производства продуктов с более высокой стоимостью, получения гемицеллюлозных сахаров в жидкой форме для снижения использования ферментов гемицеллюлаз в последующем ферментативном гидролизе также составляет основу сравнения различных вариантов предварительной обработки [17]. Процесс предобработки рассматривается в целом с учетом указанных особенностей, с расчетом их влияния на последующие стадии обработки в соответствии с капитальными и эксплуатационными затратами и стоимостью биомассы. Идеальным результатом предобработки биомассы является получение субстрата, который легко подвергается гидролизу без образования продуктов разложения сахаров и ингибиторов ферментации. Оценка процессов предобработки биомассы определяется «фактором жесткости процесса», который учитывает совокупное влияние температуры, pH и длительности предобработки. «Фактор жесткости» используется в качестве сравнительной характеристики в работах по анализу результатов предобработки биомассы, но не дает точной информации о «жесткости» условий процесса. Другими словами, он применяется для приблизительной оценки [18]. Используются различные методы предобработки лигноцеллюлозной биомассы при подготовке ее к дальнейшему гидролизу или ферментации. Эти методы подразделяются на физические, химические, биологические или их комбинацию. Ясно, что без физической предобработки в виде измельчения сырья просто не обойтись. Далее обычно используется химическая предварительная обработка слабыми кислотами, которая может изменять кристаллическую форму полисахаридов в более реакционноспособную аморфную [19]. Кислоты используются для гидролиза биомассы уже более 100 лет. Использование двухстадийного гидролиза серной кислотой для анализа лигнина датируется началом 20-го века, хотя использование концентрированной кислоты для получения сахаров было изобретено ещё в начале 19 века [20]. Первым, кто использовал серную кислоту для гидролиза древесины и выделения лигнина, был Класон в 1906 году [21]. Кроме того, слабыми кислотами можно растворить гемицеллюлозу. Преимуществами этой стадии являются повышение ферментативной доступности целлюлозы и значительно увеличенная добавленная стоимость конечной продукции [22]. Серная и соляная кислоты широко используются для слабокислотного гидролиза. В работе [23] была исследована предобработка кукурузной кочерыжки слабой серной кислотой H_2SO_4 . Оптимальными условиями предобработки являлись: концентрация

серной кислоты 0,5 % масс, температура 122°C, продолжительность обработки 20 мин. При этих условиях структурная целостность кукурузной кочерыжки изменилась, микрофибриллы целлюлозы стали более доступными для ферментов. Выход сахаров составил 80 % масс, при низкой дозировке фермента (0,024 г фермента на 1 г предварительно обработанных кукурузных початков). Также находит применение фосфорная кислота, которая менее токсична, чем другие кислоты [24]. Кроме того, после нейтрализации гидролизата, соли фосфорной кислоты можно использовать в качестве сырья для ферментации микроорганизмов [25]. Авторы работы [26] изучали предобработку кукурузной кочерыжки минеральными кислотами: H_2SO_4 , HNO_3 и H_3PO_4 . После предобработки качество гидролизата сравнивалось путем ферментации *S. beijerinckii* TISTR 1461 продуцирующих биобутанол. Было установлено, что гидролизат после предобработки фосфорной кислотой может быть использован в качестве субстрата без какого-либо удаления ингибитора. Тем не менее, при обработке сырья фосфорной кислотой наблюдался самый низкий выход общих сахаров. При оптимизации ферментативного гидролиза предварительно обработанной кукурузной кочерыжки снизилась дозировка ферментов и время гидролиза до 7,68 FPU/г биомассы и 63,88 часов, соответственно с выходом 51,82 г/л редуцирующих сахаров. В работе [27] пшеничную солому подвергали предобработке 0,5%, 1% и 2% серной кислотой при температуре 140 и 160°C. Время предобработки составляло 10, 20, 30, 45 и 60 мин. Предобработанную пшеничную солому промывали шестью объёмами воды и гидролизовали ферментными комплексами целлюлаз в течение 24-48 часов. Оптимальные условия для предварительной обработки соломы пшеницы были определены как: температура 140 °C, концентрация серной кислоты 1 %, продолжительность обработки 30 мин. В этих условиях выход глюкозы из пшеничной соломы достиг 89,0 % от теоретического максимума, в то время как концентрация муравьиной кислоты, фурфурола, уксусной кислоты и 5-оксиметилфурфурола составила $32,37 \pm 4,91$, $12,08 \pm 1,69$, $7,98 \pm 1,02$ и $1,14 \pm 0,22$ г/кг соответственно. Увеличение степени предварительной обработки привело к увеличению выработки ингибиторов, а также снижению выхода моносахаридов на 27 %. Конструкция реакторов для предобработки биомассы является важным фактором для максимальной деполимеризации гемицеллюлозы [17, 28, 29]. Для слабокислотного гидролиза биомассы перспективно применение реакторов вытеснения, противотоковых реакторов, перколяционных и противотоковых реакторов с изменяемым рабочим объёмом [17, 30, 31]. В ряде исследований [15-20] отмечается, что среди всех вышеперечисленных, противотоковые реакторы позволяют осуществлять наиболее полный гидролиз гемицеллюлоз, способствуют снижению продолжительности обработки сырья, и минимизируют образование ингибиторов [32]. Биосинтез масляной кислоты В последнее время растёт интерес к производству масляной кислоты путем ферментации в связи с

широким ее применением в химической, фармацевтической и пищевой промышленности. Однако, небольшое количество работ было посвящено ферментации масляной кислоты на гидролизатах лигноцеллюлозной биомассы. Грамположительные анаэробные бактерии, в том числе *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium aurantibutyricum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium kluyveri*, *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium tetanomorphum*, *Clostridium tyrobutyricum*, были описаны как хорошие производители масляной кислоты [33, 34] (табл. 2). В работе [35] приведены наиболее популярные штаммы, используемые в исследованиях ферментации масляной кислоты, и достигнутые результаты в разных условиях. Среди штаммов микроорганизмов, интересен *Clostridium tyrobutyricum* в связи с высоким выходом масляной кислоты (более 93% от теоретического) и высокой производительностью. В большинстве исследований для ферментации масляной кислоты используются штаммы *C. acetobutylicum* или *C. tyrobutyricum*.

Метаболические пути получения масляной кислоты из глюкозы были описаны в многочисленных источниках [36-38]. Они включают конверсию глюкозы в пируват, а затем в ацетил-КоА через путь Эмбдена-Мейергофа-Парнаса. Из ацетил-КоА могут быть образованы ацетат либо бутират. Уксусная кислота образуется с участием ферментов фосфотрансацетилазы и ацетаткиназы, в то время как масляная кислота образуется с участием КоА-трансферазы, фосфотрансбутирилазы и бутираткиназы [39].

Таблица 2 - Используемые штаммы и выход масляной кислоты [35]

Штамм (<i>Clostridium</i>)	Метод ферментации	Субстрат	t, °C	Выход, г/л
<i>C. butyricum</i> ZJUCB	Периодическая	Глюкоза	37	12.25
<i>C. butyricum</i> S21	Периодическая	Глюкоза	7.3	16.74
<i>C. tyrobutyricum</i> C	подпиткой	Глюкоза	20	7.3
<i>C. tyrobutyricum</i> CIP 1-776	Непрерывная	Глюкоза	41.65	50.11
<i>C. thermo-butyricum</i>	Периодическая	Глюкоза	45	62.8
<i>C. tyrobutyricum</i> JM1	Непрерывная	Глюкоза	55	99.38
<i>C. tyrobutyricum</i> ATCC25755	Периодическая	Глюкоза и ксилоза	37	13.76
<i>C. populeti</i>	Непрерывная	Глюкоза	24.88	6.3

Как уксусная, так и масляная кислота являются ингибиторами роста маслянокислых бактерий [40]. Для преодоления этого барьера, были разработаны новые процессы ферментации, такие как биореактор с полыми волокнами в основании. Ферментация иммобилизованными клетками в данном реакторе показала повышение устойчивости к масляной кислоте и рост производительности бактерий [41, 42]. При ферментации с подпиткой питательной средой и глюкозой, адаптированный штамм *C. acetobutylicum* достиг выработки масляной кислоты до 86,9 г/л [43]. Перспективным направлением повышения эффективности биосинтеза масляной кислоты является разработка штаммов, устойчивых к высоким концентрациям масляной кислоты. Например, штамм *C. butyricum* ZJUCB в pH-контролируемой периодической ферментации при pH 6,5 образует 12,25 г/л масляной кислоты.

При ферментации с подпиткой данный штамм производит до 16,74 г/л масляной кислоты [44]. Тем не менее, процесс ферментации масляной кислоты пока не является экономически конкурентоспособным, потому что большинство опубликованных исследований проводились с использованием стандартной дорогой питательной среды. В качестве субстрата для производства масляной кислоты перспективно использование гидролизатов лигноцеллюлозной биомассы. Так, использование в качестве субстрата тростниковой патоки при pH 6,0 позволило получить 26,2 г/л бутирата, в то время как ферментация с подпиткой дала 34,6 г/л [46]. В качестве потенциального сырья с низкой стоимостью для производства масляной кислоты был исследован топинамбур [47]. Выход масляной кислоты при культивировании штамма *C. tyrobutyricum* ZJU 8235 на гидролизате топинамбура в биореакторе с полыми волокнами составил 0,44 г/г с производительностью 2.75 г/л/ч. Вэй и соавторы [48] сообщили о производительности масляной кислоты 0,51 г/л/ч, и конверсии 0,45 г/г сахара, в биореакторе с полыми волокнами на средах, содержащих 15-20% гидролизата багассы. Необходимы дополнительные исследования по ферментации масляной кислоты на гидролизатах лигноцеллюлозного сырья для достижения рентабельного производства в промышленных масштабах. В работе [49] был использован новый штамм *Clostridium tyrobutyricum* RPT-4213, который производит бутират в анаэробных условиях. Этот штамм продуцирует 9,47 г/л масляной кислоты на среде MRS, (конверсия глюкозы 48%). Данный штамм был также использован для сбраживания предобработанных разбавленной серной кислотой гидролизатов пшеничной соломы, стеблей кукурузы, рисовой шелухи и прутьевидного проса (*Panicum virgatum*). Результаты показали, что использование питательной среды, содержащей, 50 % об. гидролизата пшеничной соломы дало выход масляной кислоты 8.06 г/л (конверсия глюкозы 46%), 50 % об. гидролизата прутьевидного проса - 6.01 г/л (конверсия глюкозы 44%). Однако, 50% об. гидролизат стеблей кукурузы ингибировал рост микроорганизмов. Штамм *Clostridium tyrobutyricum* RPT-4213 был также использован для ферментации с использованием питательной среды MRS с добавлением 60 % об. гидролизатов пшеничной соломы и прутьевидного проса. В результате использования гидролизатов пшеничной соломы получен титр масляной кислоты 9.87 г/л (конверсия глюкозы 44%) и 7.05 г/л масляной кислоты при культивировании на гидролизатах прутьевидного проса (конверсия глюкозы 42%). В работе [50] была проведена ферментация масляной кислоты на гидролизатах пшеничной соломы. Среди моносахаридов в гидролизатах преобладали глюкоза и ксилоза ($71,6 \pm 0,2$ г / л и $55,4 \pm 0,2$ г/л соответственно) с содержанием сухих веществ 20,87 %. Максимальный выход масляной кислоты (0,47 г/г сахара, 96% от теоретического выхода) был получен при pH между 6 и 7 с высокой селективностью (> 90%). Тем не менее, скорость потребления ксилозы была гораздо ниже, чем глюкозы. В работе [51] для ферментации масляной

кислоты на гидролизатах кукурузной кочерыжки использовался штамм *Clostridia butyricum* ВКПМ В-9619. Исследователи выяснили, что при ферментации штамма на гидролизате кукурузной кочерыжки с добавками мелассы в количестве 1,35 % РВИ (1% сахарозы) выход масляной кислоты составил не менее 43 % от потребленных редуцирующих веществ. Показано, что помимо гексоз (глюкоза, галактоза, манноза, фруктоза) штамм сбраживает и пентозы (ксилозу и арабинозу) и в последнюю очередь сахарозу. Основной задачей увеличения выхода масляной кислоты является повышение толерантности штаммов *Clostridia* к продуктам ферментации и снижение стоимости сырья. Лигноцеллюлозные материалы могут быть экономически эффективным источником сырья для различных химических веществ и топлива. Главным препятствием является высокая стоимость гидролиза целлюлозы в простые сахара.