ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ, 2024, том 60, № 5, с. 524–535

УДК 674.038,630.863

СПОСОБЫ ПРЕДОБРАБОТКИ ТРОСТНИКА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ ГИДРОЛИЗАТОВ С ВЫСОКИМ СОДЕРЖАНИЕМ САХАРОВ

© 2024 г. М. В. Семенова[1], А. М. Рожкова[1, *], Д. О. Осипов[1], В. Д. Телицин[1], Е. А. Рубцова[1], Е. Г. Кондратьева[1], И. С. Васильева[1], О. В. Морозова[1], А. И. Ярополов[1], А. П. Синицын[1]

[1]Федеральный исследовательский центр "Фундаментальные основы биотехнологии" РАН (ФИЦ Биотехнологии РАН), Москва, 119071 Россия

**e-mail: amrojkova@yahoo.com*

Поступила в редакцию 04.04.2024 г.
После доработки 18.04.2024 г.
Принята к публикации 26.04.2024 г.

Исследованы способы предобработки тростника (измельчение, гидротермическая обработка, обработка растворами кислот или щелочи, органосольвом, глубокими эвтектическими растворителями) и их влияние на его последующий ферментативный гидролиз комплексами целлюлаз и гемицеллюлаз. Субстраты с наибольшей реакционной способностью были получены при воздействии на тростник слабощелочного глубокого эвтектического растворителя **(ГЭР)** и раствора щелочи. Глубина ферментативного гидролиза этих предобработанных субстратов составила 63 и 59%, а степень конверсии полисахаридов (целлюлозы и гемицеллюлозы) в моносахара с учетом выхода субстрата на стадии предобработки – 60 и 34% соответственно. После предобработки тростника кислотным ГЭР, водяным паром, водным или водно-органическим раствором серной кислоты глубина ферментативного гидролиза составила 45, 25, 20 и 11%, а степень конверсии полисахаридов с учетом выхода субстрата – 26, 18, 13 и 10% соответственно. Промышленный ферментный препарат Агроцелл Плюс с преимущественным содержанием целлобиогидролаз и эндоглюканаз был наиболее эффективен при гидролизе пылевой фракции тростника, а также тростника, предобработанного раствором серной кислоты или ГЭР (кислотного или слабощелочного). Препарат Агроксил Плюс, содержащий эндоксиланазу и целлобиогидролазы, был эффективнее при гидролизе тростника после гидротермической предобработки или обработки раствором щелочи. Результаты гидролиза тростника, предобработанного кислотным или слабощелочным ГЭР, под действием индивидуальных (гомогенных) целлюлаз, свидетельствовали, что в обоих случаях ключевым ферментом была целлобиогидролаза 1.

Ключевые слова: тростник, предобработка, ГЭР, гидролиз, целлюлазы, *Penicillium verruculosum*

DOI: 10.31857/S0555109924050109 **EDN:** QSZFFG

Возобновляемая растительная биомасса, основными компонентами которой являются целлюлоза, гемицеллюлозы и лигнин, составляет основную часть органического материала на Земле и является практически неисчерпаемым источником сырья и энергии [1]. Использование быстрорастущих травянистых растений как источника природных полисахаров, несомненно, имеет преимущество перед использованием древесины. Тростник обыкновенный – почти космополит, встречается в России повсеместно. Он распространен на почвах с близкими грунтовыми водами, на болотах, зарастающих озерах, пойменных лугах; особенно многочислен он в низовьях рек, где часто образует обширные заросли. Тростник относится к злакам, содержание лигнина от 18 до 26% в разных частях растения. Легкогидролизуемые полисахариды (преимущественно ксиланы) составляют 20–25%, трудногидролизуемые (целлюлоза) – до 37% [2]. Таким образом, тростник является источником С5 и С6 сахаров, которые могут быть конвертированы в коммерчески востребованные продукты (биоэтанол, этилен, бутены, этиленгликоль и другие соединения) [1, 3–5].

Ферментативный гидролиз растительной биомассы затруднен из-за ее низкой реакционной способности вследствие присутствия лигнина, который является физическим барьером, препятствующим воздействию ферментов на целлюлозу; кроме того, на лигнине происходит непродуктивная адсорбция ферментов. Для повышения реакционной способности необходима предварительная обработка субстрата, основными задачами которой являются удаление

лигнина, разрушение кристаллической структуры целлюлозных волокон, увеличение поверхности субстрата, доступной для ферментов [6–10].

Существуют различные методы предобработки, основанные на использовании разных принципов воздействия на растительную биомассу: механические, физические, химические, физико-химические, биологические [11, 12]. Каждый из них имеет ряд положительных (повышение реакционной способности субстрата за счет увеличения доступной площади, удаления лигнина, гемицеллюлозы и пр.) и отрицательных факторов таких как высокая стоимость, необходимость переработки реагентов, образование вредных побочных продуктов и др.). Измельчение (как сухое, так и влажное) является весьма эффективным методом предварительной обработки многих видов растительного сырья. Кроме того, это один из наиболее экологически чистых видов предобработки [13–15]. Факторами, ограничивающими его применение, являются высокие энергозатраты, относительно низкая производительность и необходимость интенсивного теплоотвода, особенно при глубоком измельчении массы.

При гидротермической предобработке лигнин плавится под действием горячей воды с последующим образованием его микрочастиц (псевдолигнина) с понижением температуры, а также происходит частичный гидролиз гемицеллюлоз. Такой метод предобработки сохраняет целлюлозу в волокнистом состоянии, при этом увеличивается ее доступность для ферментов [16, 17]. Предобработка горячей водой является одним из наиболее перспективных методов, поскольку не требует использования химических веществ и является “зеленой” технологией.

Предварительная обработка щелочами приводит к удалению (солюбилизации) лигнина за счет разрыва химических связей между гемицеллюлозами и лигнином, к некоторому снижению степени полимеризации целлюлозы и набуханию ее волокон с увеличением объема пор и площади внутренней поверхности, что повышает ее реакционную способность при ферментативном гидролизе [18–22]. Этот метод является спорным с экологической точки зрения, так как приводит к необходимости утилизации и обеззараживания сточных вод, при этом используемые химикаты безвозвратно теряются в виде солей.

Широко распространена предобработка водными растворами кислот. Это приводит к разрушению лигноцеллюлозной матрицы за счет разрыва гликозидных связей, солюбилизации гемицеллюлоз и частично лигнина [23–26]. Предобработку можно проводить как с использованием концентрированных, так и разбавленных растворов кислот. Однако, использование концентрированных кислот менее предпочтительно, так как требует соблюдения более строгих мер безопасности, применения оборудования с повышенной коррозионной стойкостью, регенерацию кислот, а также приводит к более интенсивному образованию фурановых соединений – фурфурола из С5 сахаров и гидроксиметилфурфурола из С6 сахаров, способных к ингибированию микроорганизмов [27].

Предварительная органосольвная обработка направлена на сольватацию лигнина и гемицеллюлоз и проводится с использованием различных органических или водно-органических растворителей с добавлением катализаторов (или без них) при температуре 100–250°С [28–30]. Этанол получил широкое применение в качестве растворителя благодаря высокой эффективности предобработки растительной биомассы, а также простоте регенерации путем дистилляции. В качестве катализатора используют различные кислоты, чаще всего серную, соляную или уксусную. Органосольвная предобработка приводит к весьма значительному увеличению реакционной способности целлюлозы. К недостаткам можно отнести относительно высокую стоимость процесса и необходимость регенерации органических растворителей.

Делигнификация с использованием глубоких эвтектических растворителей (**ГЭР**, deep eutectic solvents) – класса растворителей, состоящих из двух компонентов, способных образовывать эвтектическую смесь с температурой плавления значительно более низкой, чем у каждого отдельного компонента – приводит к эффективной солюбилизации лигнина и гемицеллюлозы и повышает реакционную способность целлюлозы. Один из компонентов смесей выступает акцептором водородных связей (четвертичные соли аммония, например, холинхлорид), второй компонент – донором водородных связей (органические кислоты, многоосновные спирты, мочевина и другие соединения) [31–35]. Большим преимуществом метода является нетоксичность и биоразлагаемость используемых реагентов. Недостатком является относительно высокая стоимость процесса, высокая вязкость растворителей, а также необходимость рекуперации химических веществ, используемых в качестве компонентов растворителя.

При выборе способа предобработки растительной массы следует учитывать возможность гидролиза гемицеллюлоз, что создает технологический поток С5 сахаров, кроме того, могут образовываться токсичные для ферментов и микроорганизмов продукты. Учитывая это, вводят стадию разделения твердой и жидкой фракций после предобработки. Потоки С5 и С6 сахаров могут быть объединены после ферментативного гидролиза целлюлозы, или (пентозы или гексозы) могут быть использовать порознь [4, 5, 36]. В любом случае на каждой стадии следует контролировать образование С5 и С6 сахаров.

Цель настоящей работы – найти наиболее эффективный способ предобработки тростника для повышения его реакционной способности и подобрать оптимальный ферментный комплекс, обеспечивающий максимальный выход сахаров в ходе ферментативного гидролиза предобработанного тростника.

МЕТОДИКА

Ферментные препараты. В работе были использованы коммерческие препараты Агроцелл Плюс, Агроксил Премиум и Агроксил Плюс, произведенные на основе различных штаммов микроскопического гриба *Penicillium verruculosum* на предприятии ООО "Агрофермент". Кроме того, были использованы лабораторные ферментные препараты (**ФП**), полученные с помощью штамма *P. verruculosum* B537 (продуцент целлюлаз) и штамма *P. verruculosum* F10 (продуцент целлобиазы или β-глюкозидазы) [37, 38].

Штаммы *P. verruculosum* культивировали в качалочных колбах Эрленмейера емкостью 750 мл в 100 мл ферментационной среды следующего состава (%): KH_2PO_4 – 1.5, $(NH_4)_2SO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.03, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ – 0.03, глюкоза – 1.0, дрожжевой экстракт – 1.0, пшеничные отруби – 1.0, микрокристаллическая целлюлоза (**МКЦ**) – 40.0. После культивирования в течение 144 ч на качалке при 220 об./мин и 30°C культуральную жидкость (**КЖ**) отделяли от мицелия центрифугированием в течение 10 мин при 10000 g. Препараты B537 и F10 были получены путем лиофильного высушивания КЖ, продуцируемой штаммами *P. verruculosum* B1-537 (ΔniaD) и *P. verruculosum* F10 на лиофильной сушке Benchtop 6K ES (SP Scientific/Virtis, США).

Реагенты. В работе использовали сухой тростник обыкновенный из Астраханской области (Россия) грубо дезинтегрированный и измельченный на ножевой мельнице и пылевую фракцию тростника, которая накапливается в фильтрах пылеуловителя ножевой мельницы. Дезинтегрированный тростник также подвергался обработке водяным паром, растворами гидроксида натрия или серной кислоты, органосольвом, ГЭР.

В качестве субстратов для определения активностей использовали Na-соль карбоксиметилцеллюлозы (**КМЦ**), ксилан бука, *n*-нитрофенил-β-глюкопиранозид (**пНФГ**) – производства "Sigma" (США) и микрокристаллическую целлюлозу (**МКЦ,** ТУ 20.16.59-001-40693384-209, производства "Кристацелл",Россия). Для приготовления буферных смесей и солевых растворов использовали реактивы фирм "Bio-Rad Laboratories" (США), "Panreac" (Германия), "Helicon" и "Реахим" (Россия). Для получения ГЭР использовали холин хлорид (**ХХл**) ("Molekula", Англия), молочную кислоту (**МК**) ("Acros Organics", Бельгия), моноэтаноламин (**МЭА**) ("Компонент-Реактив", Россия).

Предобработка тростника. Предобработка проводилась в герметичных контейнерах из нержавеющей стали объемом 60 мл, помещенных в лабораторный аппарат для предобработки. Аппарат состоял из масляной бани, терморегулятора и двух термопар для контроля и управления температурой.

5 г дезинтегрированного тростника помещали в контейнер и добавляли 50 мл воды (обработка паром), раствора серной кислоты или гидроксида натрия нужной концентрации (0.25, 0.5, 1, 1.25% серной кислоты или 0.5, 1, 1.5, 2% гидроксида натрия) или смеси этанола с водой (40, 60, 80% этанола), содержащей 0.5% серной кислоты. Обработка велась в течение 1 ч при 120°C (кислотная или щелочная предобработка), 140°C (органосольвная) или 160°C (водяным паром).

После проведения предобработки тростник извлекали из контейнера и промывали 10 мл воды. Значение pH полученной суспензии тростника в воде доводили до 4.5–5.5 с помощью щелочи или кислоты соответственно. Затем суспензию центрифугировали в течение 10 мин при 4000 g. Супернатант удаляли (отбирали пробу для проведения анализа состава сахаров с помощью ВЭЖХ), а к оставшемуся твердому остатку добавляли 50 мл воды, ресуспендировали и снова центрифугировали при тех же условиях. Супернатант удаляли. В осадке определяли содержание сухих веществ гравиметрическим методом. На всех стадиях определяли массы супернатанта и осадка.

Получение ГЭР. Оба вида ГЭР получали путем смешивания компонентов при постоянном перемешивании в течение 6 ч при 40°C (ХХл и МК в молярном соотношении 1 : 5) или в течение 4 ч при 60°C (ХХл и МЭА в молярном соотношении 1 : 6).

Предобработка тростника ГЭР. Для выбора оптимальных условий предобработки использовали ГЭР различного состава: кислый на основе ХХл и МК, а также слабощелочной на основе ХХл и МЭА. В типичном эксперименте к 500 мг дезинтегрированного тростника добавляли 9.5 г ГЭР (загрузка 5% по массе) и прогревали при перемешивании при 80°C в течение 24 ч. Полученные растворы охлаждали до комнатной температуры и добавляли по 10 мл 50%-ного водно-этанольного раствора. Смесь перемешивали, затем центрифугировали при 7000 g. Надосадочную жидкость, содержащую лигнин и компоненты ГЭР, отделяли, осадок многократно промывали водно-этанольной смесью, затем водой.

После предобработки тростник не подвергался дополнительной сушке, хранился при 4°C не более 2 недель.

Выход субстрата после предобработки определяли, как отношение массы предобработанного тростника после высушивания до постоянного веса к массе исходного тростника.

Определение активности и концентрации ферментов. За 1 ед. активности к специфическому субстрату принимали такое количество фермента, которое катализирует образование 1 мкмоль продукта за 1 мин при pH 5.0 и 50°C.

Активность по отношению к МКЦ, КМЦ и ксилану определяли по скорости накопления восстанавливающих сахаров (**ВС**), анализируемых методом Шомоди-Нельсона; активность по отношению к пНФГл – по скорости накопления *n*-нитрофенола [39].

Содержание белка в ФП определяли методом Лоури, используя БСА в качестве стандарта.

Ферментативный гидролиз предобработанного тростника. Гидролиз субстрата (100 г/л по сухой массе в реакционной смеси) проводили под действием ФП B537, Агроцелл Плюс, Агроксил Плюс или Агроксил Премиум (10 мг белка/г субстрата или 1 мг белка/мл реакционной смеси) с добавлением ФП F10 (1 мг белка/г субстрата или 0.1 мг белка/мл реакционной смеси) в пластиковых пробирках объемом 2 или 50 мл (объем реакционной смеси 1.5 или 20 мл соответственно) в термостатируемом шейкере. Процесс гидролиза вели в присутствии 0.1 г/л антибиотика ампициллина ("Белмедпрепараты", Республика Беларусь) в 0.1 М Na-ацетатном буферном растворе pH 5.0 при 50°C в течение 48 ч.

Гидролиз субстратов, проявивших наибольшую реакционную способность, проводили также с помощью индивидуальных очищенных ферментов (целлобиогидролаз 1 и 2, эндоглюканаз 1 и 2, эндоксиланазы – все из *P. verruculosum*, β-глюкозидазы *Aspergillus niger*). Очистку ферментов проводили в соответствии с методиками, приведенными в работах [37, 38, 40]. Условия гидролиза: концентрация субстрата 40 г/л по сухой массе в реакционной смеси, концентрация фермента (целлобиогидролаз, эндоглюканаз или эндоксиланазы) 10 мг белка/г субстрата или 0.4 мг белка/мл реакционной смеси. Концентрация β-глюкозидазы 1 мг белка/г субстрата или 0.04 мг белка/мл реакционной смеси. Прочие условия гидролиза были аналогичны.

Из реакционной смеси отбирали аликвоты, в которых определяли концентрацию ВС методом Шомоди-Нельсона и состав низкомолекулярных продуктов с помощью ВЭЖХ-системы Agilent 1100 ("Agilent", США) на колонке Диасфер-110-Амин (5 мкм, 4.0 × 250 мм); в качестве элюента использовали смесь ацетонитрил-вода 75 : 25 при скорости элюции 1 мл/мин, объем анализируемого образца 10×100 мкл. В качестве стандартов использовали ксилозу, арабинозу, глюкозу, ксилобиозу и целлобиозу.

Эксперимент проводился в трех повторностях.

Глубину ферментативного гидролиза (**ГФГ**) рассчитывали, как отношение концентрации ВС после 48 ч ферментативного гидролиза к исходной концентрации субстрата (100 г/л); выражали в процентах. Степень конверсии субстрата рассчитывали, умножив концентрацию продукта (ВС или глюкозы) после 48 ч ферментативного гидролиза на выход субстрата в процессе его предобработки (в долевом эквиваленте); выражали в процентах.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Предобработка субстрата должна обеспечивать увеличение пористости поверхности субстрата, разрушению кристаллической структуры целлюлозных волокон, удалению лигнина и/или гемицеллюлозы. Изменение свойств предобработанного субстрата влечет за собой необходимость подбора и корректировки состава ферментного комплекса, используемого для гидролиза предобработанного субстрата.

В работе использовались ФП с различным содержанием ключевых гидролитических ферментов (целлобиогидролаз, эндоглюканаз, β-глюкозидазы и эндоксиланазы) (табл. 1), необходимых для разрушения основных полисахаров тростника – целлюлозы и ксилана. Так, ФП Агроцелл Плюс

Таблица 1. Содержание общего белка (мг/г), индивидуальных ферментов (% от общего белка) и удельная активность (ед./мг белка) по отношению к различным субстратам в ФП

ФП	Белок, мг/г	Фермент*				Активность			
		ЦБГ	ЭГ	ЭК	β-Г	МКЦ	КМЦ	ксилан	пНФГ
Агроцелл Плюс	71 ± 3	23 ± 2	50 ± 4	3.0 ± 0.3	1.4 ± 0.1	0.76 ± 0.07	48 ± 4	9.2 ± 0.8	0.73 ± 0.04
Агроксил Премиум	92 ± 4	22 ± 2	28 ± 2	32 ± 2	1.0 ± 0.1	0.53 ± 0.04	19 ± 2	34 ± 3	0.58 ± 0.03
Агроксил Плюс	90 ± 4	25 ± 2	2.0 ± 0.1	40 ± 4	1.5 ± 0.1	0.66 ± 0.06	5.2 ± 0.4	66 ± 6	0.76 ± 0.04
B537	950 ± 30	58 ± 5	2.6 ± 0.1	3.3 ± 0.3	3.1 ± 0.2	0.86 ± 0.08	13 ± 1	20 ± 2	1.8 ± 0.1
F10	660 ± 20	13 ± 1	2.2 ± 0.2	3.1 ± 0.3	75 ± 7	0.30 ± 0.03	3.4 ± 0.2	3.3 ± 0.2	61 ± 3

* ЦБГ – целлобиогидролаза, ЭГ – эндоглюканаза, ЭК – эндоксиланаза, β-Г – β-глюкозидаза.

характеризовался высоким содержанием эндоглюканаз (около 50% от всех белков) и, соответственно, высокой активностью по отношению к КМЦ (48 ед./мг белка). В ФП Агроксил Премиум одновременно было повышенное содержание эндоглюканаз (28%) и эндоксиланазы (32%) и активности по отношению к КМЦ и ксилану составляли 19 и 34 ед./мг белка соответственно. ФП Агроксил Плюс характеризовался высоким содержанием эндоксиланазы (40%) и высокой активностью по отношению к ксилану (66 ед./мг белка). В перечисленных трех ФП содержание целлобиогидролаз составляло 22–25%, а в ФП 537 целлобиогидролазы были основными ферментами (около 60%). ФП F10 содержал 75% β-глюкозидазы, которой было недостаточно в других ФП. Соответственно, результаты гидролиза разных видов предобработанного тростника под действием этих препаратов должны отображать изменение состояния целлюлозы и ксилана в субстрате в ходе предобработки.

Измельчение (рис. 1) тростника на ножевой мельнице не привело к улучшению результатов ферментативного гидролиза, в то время как глубина гидролиза более мелкой (пылевой) фракции, полученной при этом виде измельчения, увеличилась в 3 раза (табл. 2). В гидролизатах пылевой фракции концентрация ВС, ксилозы, арабинозы и глюкозы составила 18–20, 5–6, 0.2–0.3 и 13–14 г/л соответственно (табл. 3), что свидетельствовало о частичном гидролизе целлюлозы и гемицеллюлозы. Существенной разницы между действием на измельченный тростник того или иного из использованных в работе ФП выявлено не было.

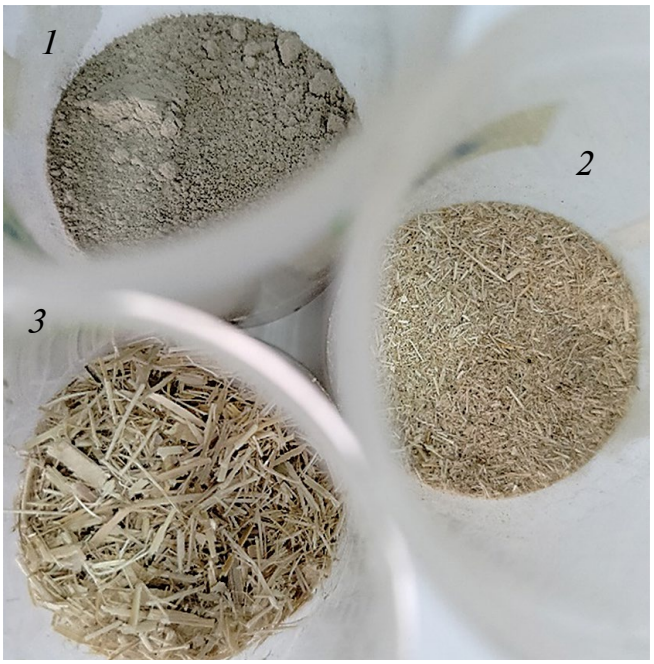

Рис. 1. Тростник с разной степенью измельчения на ножевой мельнице: *1* – пылевая фракция, *2* – грубая фракция, *3* – исходный тростник.

Накопление арабинозы в гидролизатах объясняется, по-видимому, присутствием в используемых ФП небольшого количества ферментов-гликозидаз, способных гидролизовать связи между арабинозой и ксилозой в гемицеллюлозе тростника. Так, в ферментном комплексе близкородственного гриба *P. canescens* были обнаружены арабинофуранозидаза, отщепляющая арабинозу от арабиноксилана пшеницы [41].

Следует отметить, что измельчение тростника до пылевой фракции привело к возможности проведения ферментативного гидролиза при концентрации субстрата значительно выше, чем в случае грубо измельченного тростника. Так, глубина гидролиза пылевой фракции под действием ФП Агроцелл Плюс не зависела от концентрации субстрата в диапазоне 100–250 г/л (дальнейшее увеличение концентрации субстрата приводило к проблемам с массопереносом), в то время как наибольшая концентрация грубо измельченного тростника, при которой достигалась максимальная глубина гидролиза, составляла 200 г/л (рис. 2). При увеличении концентрации грубо измельченного тростника до 250 г/л в реакционной смеси отсутствовала жидкая фаза.

Выход субстрата (нерастворимого осадка) после гидротермической предобработки тростника составил 70%, а в супернатанте была обнаружена ксилоза (2.5% от исходной массы тростника), то есть произошло частичное разрушение гемицеллюлоз и, вероятно, сольватация лигнина. Глубина гидролиза предобработанного субстрата увеличилась в 3.5 раза относительно исходного тростника (табл. 2). Наилучшие результаты при ферментативном гидролизе были получены с использованием

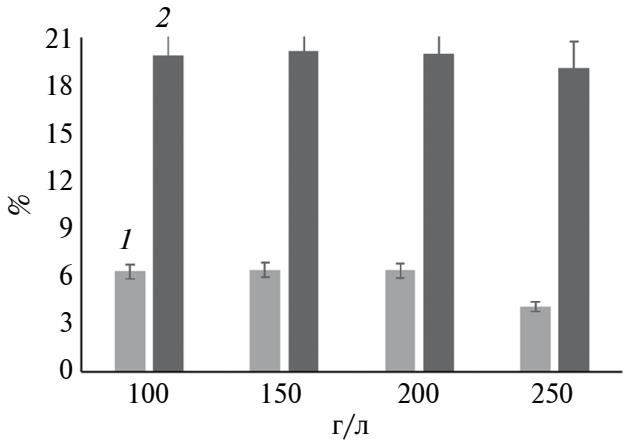

Рис. 2. Глубина гидролиза грубой (*1*) и пылевой фракций (*2*) измельченного тростника после 48 ч обработки ФП Агроцелл Плюс (10 мг белка/г субстрата) и F10 (1 мг белка/г субстрата) при 50°C, pH 5.0. На оси абсцисс указана концентрация субстрата.

Таблица 2. Выход субстрата* (%) после предобработки, глубина последующего ферментативного гидролиза** (ГФГ, %) под действием лучшего ФП и степень конверсии*** (%)

Способ и условия предобработки		Выход субстрата	ГФГ, %	Степень конверсии, %	
				полисахариды	целлюлоза
Без обработки		100	7 ± 1	7 ± 1	6 ± 1
Измельчение	Грубая фракция	100	7 ± 1	7 ± 1	6 ± 1
	Пылевая фракция	100	20 ± 2	20 ± 2	14 ± 2
Водяной пар		70	25 ± 2	18 ± 2	11 ± 2
Щелочь	0.5% NaOH	92	22 ± 2	20 ± 2	13 ± 2
	1% NaOH	64	40 ± 3	26 ± 3	19 ± 2
	1.5% NaOH	58	59 ± 4	34 ± 4	25 ± 3
	2% NaOH	57	48 ± 4	27 ± 2	22 ± 2
Кислота	0.25% H_2SO_4	73	16 ± 2	12 ± 2	9 ± 1
	0.5% H_2SO_4	69	17 ± 2	12 ± 2	9 ± 1
	1% H_2SO_4	67	17 ± 2	11 ± 2	9 ± 1
	1.25% H_2SO_4	65	20 ± 2	13 ± 2	10 ± 2
Органосольв (+0.5% H_2SO_4)	40% EtOH	91	11 ± 2	10 ± 2	7 ± 1
	60% EtOH	89	11 ± 2	10 ± 2	7 ± 1
	80% EtOH	86	10 ± 2	9 ± 2	6 ± 1
ГЭР	ХХл/МК	57	45 ± 3	26 ± 2	20 ± 2
	ХХл/МЭА	96	63 ± 4	60 ± 4	40 ± 3

* Выход субстрата – отношение массы предобработанного тростника после высушивания до постоянного веса к массе исходного тростника, в%.
** Глубина ферментативного гидролиза – отношение концентрации ВС после 48 ч ферментативного гидролиза к исходной концентрации субстрата, в %.
*** Степень конверсии – произведение концентрации продукта (ВС или глюкозы) после 48 ч ферментативного гидролиза и выхода субстрата в процессе его предобработки (в долевом эквиваленте).

ФП Агроксил Плюс (с увеличенным содержанием эндоксиланазы): концентрация ВС, ксилозы, ксилобиозы, арабинозы и глюкозы в реакционной среде составила 25, 4.8, 0.7, 0.3 и 16 г/л соответственно (табл. 3). Таким образом, гидротермическая предобработка тростника и последующий ферментативный гидролиз под действием ФП Агроксил Плюс позволяли извлечь 18% сахаров, в том числе 11% глюкозы (табл. 2).

Выход субстрата после предобработки тростника щелочью уменьшался с увеличением концентрации щелочи и составил 92% в случае 0.5%-ного NaOH и 57–58% в случае 1.5–2%-ного NaOH. В супернатантах низкомолекулярных сахаров со степенью полимеризации 1–4 методом ВЭЖХ обнаружено не было, то есть в ходе предобработки происходила солюбилизация лигнина без глубокого разрушения гемицеллюлоз. Глубина гидролиза предобработанного субстрата увеличилась в 3–8 раз относительно исходного тростника, максимальное значение этого параметра 59% соответствовало предобработке 1.5%-ным раствором NaOH (табл. 2). При ферментативном гидролизе предобработанного субстрата лучшим был ФП Агроксил Плюс (с увеличенным содержанием эндоксиланазы): концентрация ВС, ксилозы, ксилобиозы, арабинозы и глюкозы в реакционной среде составила 59, 7.2, 0.7, 1.3 и 43 г/л соответственно (табл. 3). Таким образом, предобработка тростника щелочью (1.5% NaOH) и последующий ферментативный гидролиз под действием ФП Агроксил Плюс позволяли извлечь 34% сахаров, в том числе 25% глюкозы (табл. 2).

Выход субстрата после предобработки тростника кислотой незначительно уменьшался с увеличением ее концентрации и составил 73–65%.

Таблица 3. Концентрация сахаров (г/л) после 48 ч ферментативного гидролиза предобработанного тростника (100 г/л) при pH 5.0 и 50°C, концентрация ФП 10 мг белка/г субстрата

Субстрат	ФП*	Сахара, г/л				
		ВС	ксилоза	арабиноза	глюкоза	ксилобиоза
Исходный тростник	B537	5.2 ± 0.4	1.1 ± 0.1	0.18 ± 0.02	3.4 ± 0.2	0
	АЦ	7.0 ± 0.6	1.5 ± 0.2	0.23 ± 0.02	4.8 ± 0.3	0
	АкПр	6.5 ± 0.5	1.4 ± 0.1	0.14 ± 0.01	4.3 ± 0.3	0
	АкПл	6.9 ± 0.5	1.5 ± 0.1	0.19 ± 0.01	4.4 ± 0.3	0
Пылевая фракция	B537	19 ± 2	5.7 ± 0.4	0.23 ± 0.02	13 ± 2	0
	АЦ	20 ± 2	5.9 ± 0.4	0.25 ± 0.02	14 ± 2	0
	АкПр	18 ± 2	5.1 ± 0.4	0.24 ± 0.02	13 ± 2	0
	АкПл	19 ± 2	5.9 ± 0.4	0.25 ± 0.02	13 ± 2	0
Обработанный водяным паром	B537	21 ± 2	3.5 ± 0.2	0.26 ± 0.02	12 ± 1	0.51 ± 0.03
	АкПр	23 ± 2	4.3 ± 0.3	0.30 ± 0.02	14 ± 1	0.63 ± 0.04
	АкПл	25 ± 2	4.8 ± 0.3	0.28 ± 0.02	16 ± 2	0.72 ± 0.06
Обработанный раствором 1.5% NaOH	B537	46 ± 3	2.8 ± 0.2	0.76 ± 0.04	29 ± 2	0.56 ± 0.03
	АкПр	58 ± 4	7.8 ± 0.5	1.2 ± 0.1	40 ± 3	0.68 ± 0.04
	АкПл	59 ± 4	7.2 ± 0.5	1.3 ± 0.1	43 ± 3	0.73 ± 0.04
Обработанный раствором 1.25% H_2SO_4	B537	20 ± 2	1.9 ± 0.2	0.18 ± 0.02	15 ± 2	0.63 ± 0.05
	АкПр	18 ± 2	2.4 ± 0.2	0.21 ± 0.02	11 ± 1	0.60 ± 0.04
	АкПл	19 ± 2	2.1 ± 0.2	0.19 ± 0.02	13 ± 2	0.61 ± 0.05
Обработанный 40% EtOH, 0.5% H_2SO_4	B537	8.8 ± 0.9	1.2 ± 0.1	0.14 ± 0.01	6.5 ± 0.5	0.30 ± 0.02
	АкПр	10 ± 1	1.5 ± 0.1	0.16 ± 0.01	7.0 ± 0.6	0.31 ± 0.02
	АкПл	11 ± 2	1.6 ± 0.1	0.17 ± 0.02	7.7 ± 0.6	0.32 ± 0.02
Обработанный ГЭР (ХХл/МК)	B537	40 ± 3	4.0 ± 0.3	0	32 ± 2	4.1 ± 0.3
	АЦ	45 ± 3	6.5 ± 0.5	0	35 ± 2	3.8 ± 0.3
	АкПр	38 ± 2	6.0 ± 0.5	0	29 ± 2	2.8 ± 0.2
	АкПл	39 ± 3	5.6 ± 0.4	0	30 ± 2	3.3 ± 0.3
Обработанный ГЭР (ХХл/МЭА)	B537	47 ± 3	6.4 ± 0.4	0.9 ± 0.1	31 ± 2	8.7 ± 0.6
	АЦ	63 ± 4	12 ± 1	1.7 ± 0.2	42 ± 3	6.3 ± 0.4
	АкПр	56 ± 4	13 ± 1	1.8 ± 0.2	36 ± 3	5.2 ± 0.3
	АкПл	58 ± 4	10 ± 1	1.3 ± 0.1	40 ± 3	6.2 ± 0.3

* АЦ – Агроцелл Плюс, АкПр – Агроксил Премиум, АкПл – Агроксил Плюс.

В супернатантах были обнаружены сахара (в основном ксилоза и арабиноза), количество которых кратно увеличивалось с повышением концентрации кислоты: 5.5, 9.5, 14 и 20% от исходной массы тростника в случае использования 0.25, 0.5, 1.0 или 1.25% H_2SO_4. В ходе предобработки происходило разрушение гемицеллюлоз и солюбилизация лигнина. Глубина гидролиза предобработанного субстрата увеличилась в 2.5–3 раза относительно исходного тростника и наибольшее значение 20% соответствовало предобработке 1.25%-ным раствором H_2SO_4 (табл. 2). При ферментативном гидролизе этого субстрата небольшое преимущество имел ФП B537 с высоким содержанием целлобиогидролаз: концентрация ВС, ксилозы, ксилобиозы, арабинозы и глюкозы в реакционной среде составила 20, 1.9, 0.6, 0.2 и 15 г/л соответственно (табл. 3). Таким образом, предобработка тростника кислотой (1.25% H_2SO_4) и последующий ферментативный гидролиз под действием ФП B537 позволили извлечь 13% сахаров, в том числе 10% глюкозы (табл. 2).

Выход субстрата после органосольвной предобработки тростника незначительно уменьшался с увеличением концентрации этанола и составил 91–86%. В супернатантах сахаров обнаружено не было. Глубина гидролиза предобработанного субстрата увеличилась в 1.5 раза относительно исходного тростника, практически не зависела от концентрации этанола в ходе предобработки и составила 10–11% (табл. 2). При ферментативном гидролизе субстрата лучшим был ФП Агроксил Плюс (с увеличенным содержанием эндоксиланазы): концентрация ВС, ксилозы, ксилобиозы, арабинозы и глюкозы в реакционной среде составила 11, 1.6, 0.3, 0.2 и 7.7 г/л соответственно (табл. 3). Таким образом, предобработка тростника органосольвом (40% EtOH, 0.5% H_2SO_4) и последующий ферментативный гидролиз под действием ФП Агроксил Плюс позволили извлечь 10% сахаров, в том числе 7% глюкозы (табл. 2).

Выход субстрата после предобработки тростника ГЭР зависел от состава ГЭР и составил 57 и 96% в случае использования ХХл с МК или МЭА соответственно. При воздействии ХХл с МК на тростник, вероятно, происходило разрушение гемицеллюлоз и солюбилизация лигнина, а при воздействии ХХл с МЭА этого не наблюдалось. Глубина гидролиза предобработанного субстрата увеличилась в 6 и 9 раз относительно исходного тростника и составила 45 и 63% для ХХл с МК или МЭА соответственно (табл. 2). В обоих случаях ферментативный гидролиз субстрата наиболее полно протекал при использовании ФП Агроцелл Плюс (с увеличенным содержанием эндоглюканаз): в случае предобработки ХХл с МК концентрация ВС, ксилозы, ксилобиозы, арабинозы и глюкозы в реакционной среде составила 45, 6.5, 3.8, 0 и 35 г/л, в случае ХХл с МЭА – 63, 12, 6.3, 1.7 и 42 г/л соответственно (табл. 3). Таким образом, предобработка тростника кислотным ГЭР (ХХл с МК) и последующий ферментативный гидролиз под действием ФП Агроцелл Плюс позволили извлечь 26% сахаров, в том числе 20% глюкозы, а предобработка слабощелочным ГЭР (ХХл с МЭА) при прочих равных условиях – 63% сахаров и 40% глюкозы (табл. 2).

Процесс гидролиза тростника, предобработанного двумя типами ГЭР, был изучен более подробно. Для этого был проведен гидролиз субстратов очищенными индивидуальными ферментами целлюлазного комплекса (целлобиогидролазами 1 и 2, эндоглюканазами 1 и 2) и эндоксиланазой в присутствии дополнительной гомогенной β-глюкозидазы (10% от общей загрузки по белку). Среди индивидуальных ферментов наибольшую активность по отношению к обоим субстратам проявляла целлобиогидролаза 1 при начальной концентрации предобработанного ХХл с МК или МЭА субстрата 40 г/л было получено 16 и 20 г/л ВС соответственно (рис. 3). Глубина гидролиза при этом составила 40 и 50% только под действием целлобиогидролазы 1. Эндоглюканаза 1 проявляла высокую активность по отношению к тростнику, предобработанному ХХл с МЭА (концентрация ВС 16 г/л, глубина гидролиза 40%), и была намного менее активна к тростнику, предобработанному ХХл с МК (3.4 г/л ВС, глубина гидролиза 8.5%). Остальные ферменты (целлобиогидролаза 2, эндоглюканаза 2 и эндоксиланаза) проявляли меньшую активность по отношению к тростнику, предобработанному ХХл с МЭА (5-8 г/л ВС, 12–20% глубина гидролиза), и к тростнику, предобработанному ХХл с МК (2–3 г/л ВС, 4.5–7.5% глубина гидролиза).

При гидролизе предобработанного ГЭР тростника смесями очищенных ферментов наблюдался ярко выраженный синергетический эффект в

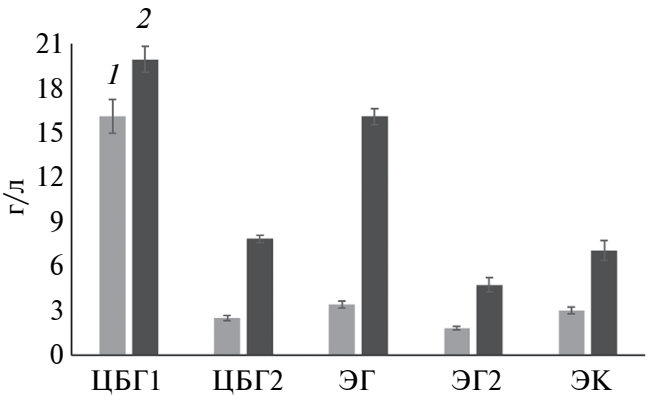

Рис. 3. Концентрация ВС после 48 ч гидролиза тростника (40 г/л), предобработанного ГЭР ХХл с МК (*1*) или МЭА (*2*), под действием очищенных ферментов (10 мг белка/г субстрата) с добавлением β-глюкозидазы (1 мг белка/г субстрата) при 50°С, pH 5.0: ЦБГ – целлобиогидролаза, ЭГ – эндоглюканаза, ЭК – эндоксиланаза.

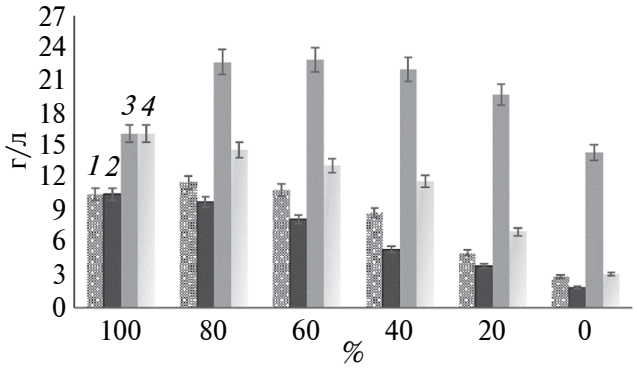

Рис. 4. Концентрация ВС после 48 ч гидролиза тростника (40 г/л), предобработанного ГЭР ХХл с МК (*1*, *2*) или МЭА (*3*, *4*), под действием смесей очищенных ферментов (4.5 мг общего белка/г субстрата) с добавлением β-глюкозидазы (0.45 мг белка/г субстрата) при 50°С, pH 5.0: *1* и *3* – смеси ЦБГ с ЭГ; *1*, *2* и *4* – с ЭК. На оси абсцисс указано процентное содержание целлобиогидролаз в смесях относительно общего содержания ферментов.

действии целлобиогидролаз и эндоглюканазы 1 на субстрат, полученный обработкой ХХл с МЭА, и менее выраженный синергетический эффект при действии этой же смеси на субстрат, полученый обработкой ХХл с МК (рис. 4). Максимальные значения коэффициентов синергизма (1.5 и 1.4 для предобработанного ХХл с МЭА или МК соответственно) наблюдали для соотношения целлобиогидролаза : эндоглюканаза 1 = 60 : 40. Синергетическое взаимодействие целлобиогидролаз с эндоксиланазой было значительно менее выражено для обоих субстратов. Глубина гидролиза предобработанного субстрата (тростник, обработанный ХХл с МЭА) с высоким содержанием ксилана (до 20%) мало зависела от содержания в реакционной смеси эндоксиланазы, что, вероятно, объясняется наличием у целлобиогидролазы 1 и эндоглюканазы 1 ксиланазной активности [33].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Сырая растительная биомасса малопригодна для ферментативной деструкции вследствие низкой реакционной способности. Целлюлоза устойчива к действию ферментов из-за своей нерастворимости и прочной структуры, обусловленной высокой кристалличностью. Лигнин является главным защитным средством для растения, препятствующим деструкции полисахаридов ферментами (он является физическим барьером и природным адсорбентом для многих ферментов). Гемицеллюлозы в составе лигноуглеводного комплекса также вносят вклад в низкую реакционную способность растительной биомассы, экранируя целлюлозу. Глубина ферментативного гидролиза пшеничной соломы, овсяной шелухи, кукурузных стеблей, хвойных и лиственных опилок невелика и составляет 5–12% от сухого вещества сырья [36]. В настоящей работе глубина гидролиза грубо дезинтегрированного тростника составила 7%. Таким образом, тростник можно отнести к сырью с низкой реакционной способностью.

Грубая фракция тростника, измельченного на ножевой мельнице, проявляла низкую реакционную способность при ферментативном гидролизе, в то время как его пылевая фракция обладала значительно лучшей гидролизуемостью – 20% сухого вещества конвертировалось в сахара. Учитывая, что стебли тростника содержат 37% целлюлозы и 21% гемицеллюлозы [2], степень конверсии целлюлозы до глюкозы составила около 38% целлюлозы, гемицеллюлоз до ксилозы и арабинозы – 29%. Важным преимуществом использования пылевой фракции оказалась возможность проведения ферментативного гидролиза субстрата высокой концентрации.

Измельчение, как способ увеличения реакционной способности субстрата, был эффективен при использовании планетарной мельницы-активатора АГО-2С [42]. Ферментативный гидролиз измельченных пшеничных отрубей привел к близкому к теоретическому выходу сахаров (62.4%) и практически полной конверсии углеводной составляющей. В работе [14] сравнивали выход сахаров в ходе ферментативного гидролиза рисовой соломы, подвергнутой мокрому дисковому помолу и шаровому помолу: выход глюкозы и ксилозы составил 78.5 и 41.5, 89.4 и 54.3% соответственно, т.е. конверсия целлюлозы в обоих случаях была выше конверсии ксилана. Измельчение пшеничной соломы в шаровой мельнице до частиц менее 100 мкм приводило к общему выходу углеводов 46%, глюкозы – 72% вследствие доказанного снижения кристалличности целлюлозы [15].

Гидротермическая предобработка была эффективной для рисовой соломы [14] и мискантуса – близкородственного тростнику злака [17]. В первом случае выход глюкозы и ксилозы после ферментативного гидролиза предобработанного при 180°С субстрата составил 70.3 и 88.6%, во втором случае обработка субстрата при 200°С обеспечивала практически полное удаление гемицеллюлозы, а последующий ферментативный гидролиз приводил к высвобождению 48% редуцирующих сахаров. В настоящей работе гидротермическая обработка тростника при 160°С приводила к частичному разрушению гемицеллюлоз (12% от общего содержания), а последующий ферментативный гидролиз обеспечивал конверсию 18% полисахаридов (из них 11% целлюлозы) в низкомолекулярные сахара.

Среди химических методов предобработки тростника наиболее эффективным оказалось использование слабощелочных растворов (по сравнению с растворами кислот). Так, обработка 1.5%-ным раствором NaOH или ГЭР ХХл с МЭА, в ходе

которой не наблюдалось глубокого разрушения гемицеллюлозы, и последующий ферментативный гидролиз приводили к конверсии 34% полисахаридов (из них 25% целлюлозы) в низкомолекулярные сахара (1.5% NaOH) или к конверсии 60% полисахаридов (40% целлюлозы) до моносахаров (ГЭР). В литературе отмечена эффективность предобработки древесины тополя в растворах NaOH, $Ca(OH)_2$ или аммиака [18], багассы (стеблей сахарного тростника) в растворе NaOH [36], кукурузной соломы в растворе NaOH и H_2O_2 (щелочно-окислительная обработка) [20] или в растворе Na_3PO_4 и Na_2S [21]. Все авторы отмечают высокую степень конверсии предобработанного субстрата в глюкозу и ксилозу – от 55 до 91%. Процессы делигнификации и их влияние на выход ферментативного гидролиза предобработанных с помощью щелочных ГЭР кукурузных початков были изучены в работе [43]. При использовании ХХл/мочевина выход продуктов гидролиза составил 59% при оптимальной температуре предобработки 115°C, а при использовании ХХл/имидазол в диапазоне температур 80–150°C был еще выше (92–95%).

Во многих работах отмечается большая эффективность кислого ГЭР для предобработки растительной биомассы [31, 44–46]. В качестве донора водорода в таких смесях используются, как правило, органические кислоты. Ранее [46] сообщалось об эффективной предобработке тростника с помощью ГЭР на основе ХХл и молочной или щавелевой кислот. В оптимизированных условиях предобработки были получены субстраты, глубина ферментативного гидролиза которых составляла 80 и 86% соответственно. В настоящей работе показано, что щелочной ГЭР в отношении тростника не менее эффективен. Следует отметить, что вне зависимости от свойств ГЭР (кислый или щелочной), используемого на стадии предобработки тростника, ключевым ферментом в ходе гидролиза была целлобиогидролаза 1, а ее синергетическое взаимодействие с эндоглюканазой 1 обеспечивало высокий выход не только глюкозы, но и ксилозы.

В настоящей работе наименьшее увеличение реакционной способности тростника наблюдалось при использовании водных и водно-органических растворов серной кислоты: максимальная глубина последующего ферментативного гидролиза составляла 20 и 10% соответственно. Кислотная обработка была эффективной для пшеничной соломы, аннской травы и багассы [23], скорлупы миндаля [26], соевых оболочек [47] – суммарный выход сахаров на стадиях предобработки и ферментативного гидролиза составил более 80%. В работе [48] было исследовано влияние предобработки древесных опилок водными и водно-органическими растворами кислот на ферментативное осахаривание. Наиболее эффективной была предобработка водным раствором 4.8% азотной кислоты, которая увеличивала реакционную способность субстрата более чем в 5 раз, а использование органосольва (65% этанола или бутанола, 0.5% серной кислоты) приводило к повышению реакционной способности в 3–4 раза по сравнению с исходным сырьем.

Таким образом, для повышения реакционной способности тростника с целью его дальнейшего ферментативного гидролиза до моносахаров эффективны методы щелочной, в особенности щелочным ГЭР, гидротермической предобработки, измельчение до пылевых частиц. Наименее эффективным было использование кислотного органосольва. Для глубокого ферментативного гидролиза предобработанного тростника оптимальным является комплекс из целлобиогидролаз, эндоглюканаз и, в некоторых случаях, эндоксиланазы – ФП Агроцелл Плюс или Агроксил Плюс.

ФИНАНСИРОВАНИЕ. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования (Соглашение № 075-15-2022-1226 от 17.10.2022).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ. Настоящая работа выполнена без привлечения людей или животных в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Гусаков А.В., Синицын А.П.* // Химия биомассы: биотоплива и биопластики. М.: Научный мир, 2017. 789 с. ISBN 978-5-91522-451-2
2. Количественный химический анализ растительного сырья. / Ред. В.И. Шарков, И.И. Куйбина, Ю.П. Соловьева, Т.А. Павлова. М.: Лесная промышленность, 1976. С. 63–64.
3. *Dibyajyoti H., Kumar P.* // Process Biochem. 2020. V. 89. P. 110–133. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.10.001
4. *Gusakov A.V.* // Biofuels. 2013. V. 4. № 6. P. 567–569. https://doi.org/10.4155/bfs.13.55
5. *Teter S.A., Brandon S.K., Emme B.* Enzymatic Processes and Enzyme Development in Diorefining // Advances in Biorefineries. 2014. P. 199–233. https://doi.org/10.1533/9780857097385.1.199
6. *Sun Q., Foston M., Meng X., Sawada D., Pingali S.V., O'Neill H. M.,et al.* // Biotechnol. Biofuels. 2014. V. 7. № 150. P. 1–14. https://doi.org/10.1186/s13068- 014-0150-6
7. *Yang B., Dai Z., Ding S.-Y., Wyman C.E.* // Biofuels. 2011. V. 2. № 4. P. 421–449. https://doi.org/10.4155/bfs.11.116
8. *Kumar P., Barrett D.M., Delwiche M.J., Stroeve P.* // Ind. Eng. Chem. Res. 2009. V. 48. P. 3713–3729. https://doi.org/10.1021/ie801542g

9. *Karimi K., Taherzadeh M.J.* // Bioresour. Technol. 2016. V. 200. P. 1008–1018. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.11.022
10. *Liguori R., Ventorino V., Pepe O., Faraco V.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2016. V. 100. № 2. P. 597–611. https://doi.org/10.1007/s00253-015-7125-9
11. *He Y.-C., Ma C.-L., Yang B.* // Fungal Cellulolytic Enzymes. Microbial production and application. / Ed. Xu Fang, Yinbo Qu. Springer. 2018. P. 1–25. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0749-2_1
12. *Alvira P., Tomáspejó E., Ballesteros M., Negro M.J.* // Bioresour. Technol. 2010. V. 101. № 13. P. 4851–4861. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.093
13. *Paudel S.R., Banjara S.P., Choi O.K., Park K.Y., Kim Y.M., Lee J.W.* // Bioresour. Technol. 2017. V. 245. P. 1194–1205. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.182
14. *Hideno A., Inoue H., Tsukahara K., Fujimoto S., Minowa T. Inoue S., Endo T., Sawayama S.* // Bioresour. Technol. 2009. V. 100. P. 2706–2711. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.12.057
15. *Ghizzi G., Silva D., Couturier M., Berrin J.-G., Buléon A., Rouau, X.* // Bioresour. Technol. 2012. V. 103. P. 192–210. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.073
16. *Bobleter O., Concin R.* // Cellulose Chemistry and Technol. 1979. V. 13. P. 583–593.
17. *Павлов И.Н.* // Ползуновский вестник. 2018. № 1. С. 148–152. https://doi.org/10.25712/ASTU.2072-8921.2018.01.028
18. *Bali G., Meng X., Deneff J.I., Sun Q., Ragauskas A.J.* // ChemSusChem. 2015. V. 8. P. 275–279. https://doi.org/10.1002/cssc.201402752
19. *Prajapati B.P., Jana U.K., Suryawanshi R.K., Kango N.* // Renewable Energy. 2020. V. 152. P. 653–663. https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.01.063
20. *Liu I., Li Z.* // RSC Advances. 2017. V. 7. P. 47456–47463. https://doi.org/10.1039/C7RA08101D
21. *Qing Q., Zhou L.L., Guo Q., Huang M.Z., He Y.C., Wang L.Q., Zhang Y.* // Bioresour. Technol. 2016. V. 218. P. 209–216. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.063
22. *Rabemanolontsoa H., Saka S.* // Bioresour. Technol. 2016. V. 199. P. 83–91. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.029
23. *Mishra A., Ghosh S.* // Fuel. 2019. V. 236. P. 544–553. https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.09.024
24. *Woiciechowski A. L., Dalmas Neto C.J., Vandenberghe L.P.S., Carvalho Neto D.P., Sydney A.C.N., Letti L.A.J. et al.* // Bioresour. Technol. 2020. V. 304. 122848. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122848
25. *Yu Z., Du Y., Shang X., Zheng Y., Zhou J.* // Industrial Crops and Products. 2018. V. 124. P. 555–562. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.08.029
26. *Nitsos C., Matsakas L., Triantafyllidis K., Rova U., Christakopoulos P.* // Biofuels. 2018. V. 9. P. 545–558. https://doi.org/10.1080/17597269.2017.1378988
27. *Liu Q., Li W., Ma Q., An S., Li M., Jameel H., Chang H.M.* // Bioresour. Technol. 2016. V. 211. P. 435–442. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.131
28. *Ostovareh S., Karimi K., Zamani A.* // Industrial Crops and Products. 2015. V. 66. P. 170–177. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.12.023
29. *He Y.C., Liu F., Di J.H., Ding Y., Tao Z.C., Zhu Z.Z. et al.*. // Industrial Crops and Products. 2016. V. 81. P. 129–138. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.11.079
30. *Arato C., Kendall P., Gjennstad G.* // Appl. Biochem. and Biotechnol. 2005. V. 123. P. 871–882. https://doi.org/10.1007/978-1-59259-991-2_74
31. *Satlewal A., Agrawal R., Bhagia S., Sangoro J., Ragauskas A.J.* // Biotechnol. Adv. 2018. V. 3. P. 2032–2050. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.08.009
32. *Zhao H., Baker G.A.* // J. Chemical Technol. and Biotechnol. 2012. V. 88. P. 3–12. https://doi.org/10.1002/jctb.3935
33. *New E.K., Wu T.Y., Lee C.B., Poon Z.Y., Loow Y.-L., Foo L.Y.W. et al.* // Process Safety and Environmental Protection. 2019. V. 123. P. 190–198. https://doi.org/10.1016/j.psep.2018.11.015
34. *Chen Z., Jacoby W.A., Wan C.* // Bioresour. Technol. 2019. V. 279. P. 281–286. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.126
35. *Chong G., Di J., Ma C., Wang D., Wang C., Wang L., Zhang P., Zhu J., He Y.* // Bioresour. Technol. 2018. V. 261. P. 196–205. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.015
36. *Синицын А.П., Синицына О.А.* // Успехи биологической химии. 2021. Т. 61. С. 347–414.
37. *Morozova V.V., Gusakov A.V., Andrianov R.M., Pravilnikov A.G., Osipov D.O., Sinitsyn A.P.* // Biotechnol. J. 2010. V. 5. № 8. P. 871–880. https://doi.org/10.1002/biot.201000050
38. *Dotsenko G.S., Gusakov A.V., Rozhkova A.M., Korotkova O.G., Sinitsyn A.P.* // Process Biochem. 2015. V. 50. P. 1258–1263. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.05.008
39. *Синицын А.П., Черноглазов В.М., Гусаков А.В.* Итоги науки и техники. М.: ВИНИТИ, Биотехнология. 1990. № 25. С. 148.
40. *Korotkova O.G., Semenova M.V., Morozova V.V., Zorov I.N., Sokolova L.M., Bubnova T.M. et al.* // Biochemistry (Moscow). 2009. V. 74. № 5. P. 569–577. https://doi.org/10.1134/S0006297909050137

41. *Синицына О.А., Бухтояров Ф.Е., Гусаков А.В., Окунев О.Н., Беккаревич А.О. и др.* // Биохимия. 2003. Т. 68. № 11. С. 1494–1505.
42. *Осипов Д.О., Булахов А.Г., Короткова О.Г., Рожкова А.М., Дуплякин Е.О. и др.* // Катализ в промышленности. 2016. Т. 16. С. 75–82. https://doi.org/10.18412/1816-0387-2016-5-75-82
43. *Procentese A., Johnson E., Orr V., Garruto Campanile A., Wood J.A., Marzocchella A. et al.* // Biores. Technol. 2015. V. 192. P. 31–36. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.05.053
44. *Zhang C.-W., Xia S.-Q., Ma P.-S.* // Biores. Technol. 2016. V. 219. P. 1–5. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.07.026
45. *Wahlstrom R., Hiltunen J., Pitaluga De Souza Nascente Sirkka M., Vuoti S., Kruus K.* // RSC Adv. 2016. V. 6. № 72. P. 68100–68110. https://doi.org/10.1039/C6RA11719H
46. *Семенова М.В., Васильева И.С., Ярополов А.И., Синицын А.П.* // Прикл. биохимия микробиология. 2023. Т. 59. №3. С. 253–259. https://doi.org/10.31857/S0555109923030169
47. *Синицын А.П., Осипов Д.О., Цурикова Н.В., Великорецкая И.А., Шашков И.А., Зверев С.В.* // Биотехнология. 2016. Т. 1. С. 27–36. https://doi.org/10.21519/0234-2758-2016-1-27-36
48. *Доценко Г.С., Осипов Д.О., Зоров И.Н., Синицын А.П.* // Катализ в промышленности. 2015. Т. 15. С. 67–73. https://doi.org/10.18412/1816-0387-2015-5-67-73

Methods for Pre-Processing Cane to Obtain Enzymative Hydrolysates with High Sugar Content

M. V. Semenova[a], A. M. Rozhkova[a, *], D. O. Osipov[a], V. D. Telitsin[a], E. A. Rubtsova[a], E. G. Kondrat'eva[a], I. S. Vasil'eva[a], O. V. Morozova[a], A. I. Yaropolov[a], and A. P. Sinitsyn[a]

[a]*Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*
**e-mail: amrojkova@yahoo.com*

Methods of cane pretreatment (grinding, hydrothermal treatment, treatment with acid or alkali solutions, organosolv, deep eutectic solvents) and their effect on its subsequent enzymatic hydrolysis by cellulases and hemicellulases complexes have been studied. Substrates with the highest reactivity were obtained by exposing the cane to a weakly alkaline deep eutectic solvent (**DES**) and an alkali solution. The depth of enzymatic hydrolysis of these pretreated substrates was 63 and 59%, and the degree of conversion of polysaccharides (cellulose and hemicellulose) into monosaccharides taking into account the yield of the substrate at the pre-processing stage was 60 and 34%, respectively. After pre-treatment of the cane with acid DES, water steam, water or water/organic solution of sulfuric acid the depth of enzymatic hydrolysis was 45, 25, 20 and 11%, and the degree of polysaccharide conversion was 26, 18, 13 and 10%, respectively. The industrial enzyme preparation Agrocell Plus with a predominant content of cellobiohydrolases and endoglucanases was most effective in hydrolyzing the dust fraction of cane, as well as cane pretreated with a solution of sulfuric acid or DES (acidic or alkaline). The industrial enzyme preparation Agroxil Plus, containing endoxylanase and cellobiohydrolases, was more effective in hydrolyzing cane after hydrothermal pretreatment or alkali solution. The results of the hydrolysis of cane pretreated with acidic or weakly alkaline DES under the action of individual (homogeneous) cellulases indicate that in both cases the key enzyme was cellobiohydrolase 1.

Keywords: cane, pretreatment, deep eutectic solvents, hydrolysis, cellulases, *Penicillium verruculosum*