

Научная статья
УДК 664.162.036.4:577.15
EDN: YXAMLK
DOI: 10.21285/achb.933



Ферментативный гидролиз высококонцентрированных субстратов, полученных из мискантуса гигантского

Е.А. Скиба*✉, Е.И. Кашеева*, В.Н. Золотухин*, А.А. Кухленко**

*Институт проблем химико-энергетических технологий СО РАН, Бийск, Российская Федерация

**АО «Специальное конструкторско-технологическое бюро «Катализатор»»,
Новосибирск, Российская Федерация

Аннотация. В работе впервые исследуется ферментативный гидролиз четырех видов субстратов, полученных из мискантуса гигантского сорта КАМИС российской селекции, с помощью авторских методов химической предварительной обработки, проводимой при атмосферном давлении с использованием разбавленных растворов HNO_3 и NaOH . Одностадийная предварительная обработка мискантуса гигантского позволяет повысить содержание полисахаридов до 90,4–90,8%, а двустадийная обработка – до 98,3–99,4%. Результаты опытных данных ферментативного гидролиза четырех полученных субстратов в диапазоне начальных концентраций от 30 до 120 г/л аппроксимированы с использованием подходов фрактальной кинетики. Повышение начальных концентраций субстрата в указанном диапазоне приводит к повышению начальной скорости гидролиза в 2,8–3,3 раза и снижению выхода редуцирующих сахаров на 12,4–13,1%. Все четыре вида предобработки оказались чрезвычайно эффективны для мискантуса гигантского, так как обеспечили повышение реакционной способности к ферментативному гидролизу в 34–36 раз по сравнению с исходным сырьем. Сниженные выходы редуцирующих сахаров наблюдаются при ферментативном гидролизе продукта щелочной делигнификации мискантуса гигантского, что связано с устойчивостью мискантуса гигантского к обработке гидроксидом натрия. Повышение начальной концентрации субстратов от 60 до 90 г/л не приводит к существенному снижению выхода редуцирующих сахаров, поэтому ферментативный гидролиз высококонцентрированных субстратов может успешно использоваться для получения биотоплив и биохимикатов.

Ключевые слова: мискантус гигантский, ферментативный гидролиз, высокая концентрация, фрактальная кинетика.

Финансирование. Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда № 22-13-00107, <https://rscf.ru/project/22-13-00107/>.

Для цитирования: Скиба Е.А., Кашеева Е.И., Золотухин В.Н., Кухленко А.А. Ферментативный гидролиз высококонцентрированных субстратов, полученных из мискантуса гигантского // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2024. Т. 14. N 3. С. 394–405. DOI: 10.21285/achb.933. EDN: YXAMLK.

Enzymatic hydrolysis of highly concentrated substrates obtained from *Miscanthus giganteus*

Ekaterina A. Skiba*✉, Ekaterina I. Kashcheyeva*,
Vladimir N. Zolotukhin*, Alexey A. Kukhlenko**

*Institute for Problems of Chemical and Energetic Technologies SB RAS, Biysk, Russian Federation

**Joint Stock Company "Special Design and Technology Bureau "Catalyst", Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. This work is the first to study the enzymatic hydrolysis of four types of substrates obtained from *Miscanthus giganteus* of the KAMIS variety of Russian breeding. The study was conducted using the authors' methodology based on a chemical pretreatment of substrates at atmospheric pressure with HNO_3 and NaOH dilute solutions. A one-stage pretreatment of *Miscanthus giganteus* allows the polysaccharide content to be increased up to 90.4–90.8%, compared to 98.3–99.4% following a two-stage treatment. The experimental results of enzymatic hydrolysis of the four obtained substrates in the range of initial concentrations from 30 to 120 g/l are approximated using fractal kinetics approaches. An increase in the initial substrate concentrations in the specified range leads to an increase in the initial hydrolysis rate by 2.8–3.3 times and a decrease in the yield of reducing sugars by 12.4–13.1%. All four pretreatment types turned out to be extremely effective for *Miscanthus giganteus*, ensuring an increase in the reactivity to enzymatic hydrolysis by 34–36 times compared to the starting raw material. Lowered yields of reducing sugars are observed during enzymatic hydrolysis of the alkaline delignification product of *Miscanthus giganteus*, which is associated with the resistance of *Miscanthus giganteus* to treatment with sodium hydroxide. An increase in the initial concentration of substrates from 60 to 90 g/l does not lead to a significant decrease in the yield of reducing sugars. Therefore, enzymatic hydrolysis of highly concentrated substrates can be successfully used to produce biofuels and biochemicals.

Keywords: miscanthus, pretreatment, enzymatic hydrolysis, high concentration, fractal kinetics

Funding. The Russian Science Foundation supported this research (no. 22-13-00107, <https://rscf.ru/project/22-13-00107/>).

For citation: Skiba E.A., Kashcheyeva E.I., Zolotukhin V.N., Kukhlenko A.A. Enzymatic hydrolysis of highly concentrated substrates obtained from *Miscanthus giganteus*. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2024;14(3):394-405. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.933. EDN: YXAMLK.

ВВЕДЕНИЕ

В связи с исчерпанием невозобновляемых углеводородов перед мировым сообществом встала задача поиска возобновляемого сырья для его трансформации в широкий спектр продуктов химического и микробиологического синтеза. В настоящее время общепризнано, что именно целлюлозосодержащее сырье является базовым для развития экономики замкнутого цикла – это дает основания называть ее биоэкономикой замкнутого цикла (экономикой, построенной на биологических ресурсах) [1, 2].

В настоящее время целлюлозосодержащее сырье рассматривается намного шире, чем древесина и отходы ее переработки: это и пожнивные остатки, и биомасса энергетических растений, и целлюлозная фракция бытовых отходов [3–5]. Наиболее эффективным источником биомассы являются энергетические растения, а одним из самых значимых энергетических растений во всем мире признан мискантус [6–9]. Как показали обзоры [8, 9], основными отраслями использования мискантуса являются энергетика, строительство, целлюлозно-бумажная промышленность, химическая промышленность и биотехнологическое производство. Биотехнологическое производство неслучайно стоит в

этом списке на последнем месте – его эффективность является дискуссионным вопросом: в литературе есть иллюстрации как успешного применения мискантуса (например, для синтеза биоэтанола [6, 7]), так и не очень успешного его использования (например, для синтеза фумаровой кислоты [10]).

Известно, что в трансформации любого целлюлозосодержащего сырья в продукты биотехнологического синтеза ключевой стадией, определяющей эффективность всего процесса, является предварительная обработка [3]. Второй по значимости и тесно связанной с первой является стадия ферментативного гидролиза [11].

Факторов, влияющих на эффективность конверсии целлюлозосодержащего сырья в редуцирующие сахара (РС), очень много. Условно можно разбить их на две группы: влияние ферментов и влияние субстратов (их происхождения и способов получения). Эти две группы факторов тесно связаны и оказывают друг на друга взаимное влияние. Несогласованность действия ферментов приводит к неполному гидролизу целлюлозы и гемицеллюлоз, поэтому выход сахаров ниже теоретических значений [3].

При переходе на высококонцентрированные субстраты выход сахаров неизбежно будет уменьшаться,

поэтому повышение концентраций низкоферментативных субстратов бессмысленно. Выход сахаров уменьшается из-за повышения вязкости реакционной массы, что приводит к снижению эффективности биоконверсии целлюлозы, кроме того, при увеличении концентрации сахаров происходит ингибирование целлюлаз согласно принципу обратной связи [12]. Ко всему прочему, повышение вязкости реакционной массы приводит к снижению эффективности перемешивания и теплопередачи и, как следствие, к большому энергопотреблению [13, 14].

Тем не менее переход к высококонцентрированным концентрациям субстратов необходим для ряда биотехнологических производств, например, для получения биоэтанола. Осуществление процесса ферментативного гидролиза при повышенных концентрациях субстрата позволяет снизить себестоимость готовой продукции, так как обеспечивает повышение выхода целевого продукта. Повышение выхода достигается благодаря сокращению продолжительности процесса, уменьшению дозировки ферментов и снижению вероятности микробной контаминации.

Исследования поведения субстратов в процессе ферментативного гидролиза при их повышенных концентрациях имеют важное практическое значение для прогнозирования выходов целевых продуктов микробиологического синтеза (из растворов РС, полученных в процессе ферментативного гидролиза) и для экономической оценки потенциальных производств. В данной работе впервые исследуется зависимость эффективности ферментативного гидролиза от начальной концентрации четырех субстратов, полученных авторскими способами из мискантуса гигантского, выращенного в Российской Федерации.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве сырья в работе использовали мискантус гигантский (*Miscanthus × giganteus*) сорта КАМИС российской селекции урожая 2022 г., который был предоставлен ООО «Мастер Брэнд», г. Москва. Четыре субстрата для ферментативного гидролиза были получены в лабораторных условиях обработкой сырья при атмосферном давлении и температуре 90–96 °С в одну или две стадии:

- 1) продукт азотнокислой обработки (ПАО) – получен обработкой сырья 4%-м раствором HNO_3 в одну стадию;
- 2) продукт щелочной делигнификации (ПЩД) – получен обработкой сырья раствором 4%-го NaOH в одну стадию;
- 3) техническая целлюлоза, азотнокислый способ (ЦАС) – получен в две стадии путем обработки ПАО раствором 4%-го NaOH ;
- 4) техническая целлюлоза, модифицированный щелочной способ (ЦМЩС) – получен в две стадии путем обработки ПЩД раствором 4%-й HNO_3 .

Полученные образцы высушивались на воздухе для анализа химического состава и дальнейшего ферментативного гидролиза. Массовая доля сухих веществ

образцов определялась на анализаторе влажности MB 23 (Ohaus, США). Анализ химического состава субстратов проводился по общепринятым для анализа растительного сырья «мокрым» методам. Массовая доля целлюлозы по Кюршнеру в образцах ПАО и ПЩД определялась путем экстракции смесью HNO_3 и спирта в соотношении 1:4 в течение 4 ч [15]. Массовая доля α -целлюлозы в образцах ЦАС и ЦМЩС оценивалась количественным определением нерастворившегося в 17,5%-м растворе гидроксида натрия остатка субстрата¹. Массовая доля остаточного лигнина оценивалась в соответствии с методикой TAPPI T 222 om-02². Массовая доля пентозанов определялась спектрофотометрическим способом на UNICO UV-2804 (United Products and Instruments, США) с использованием раствора орцина³. Зольность оценивалась путем сжигания образца при 600 °С в течение 3 ч³.

Ферментативный гидролиз проводился с помощью композиции из ферментных препаратов «Целлолюкс-А» («Сиббиофарм», Россия) и «Ультрафло Коре» (Novozymes A/S, Дания) в 0,05 М ацетатном буферном растворе (рН 4,7). Начальные концентрации субстратов составляли 30, 60, 90 и 120 г/л. Ферментные препараты добавлялись в избытке: «Целлолюкс-А» – 0,1 г/г субстрата, «Ультрафло Коре» – 0,3 мл/г субстрата. Объем ацетатного буфера – 150 мл, температурный режим – (46 ± 2) °С, скорость перемешивания – 150 об/мин. Процесс гидролиза осуществлялся с использованием горизонтального перемешивающего устройства ЭКРОС ПЭ-6410 с нагревом («Экохим», Россия). Через определенные промежутки времени проводился отбор проб из гидролизатов для определения концентрации РС с помощью спектрофотометра Cary 60 UV-Vis (Agilent Technologies, США) при длине волны 530 нм с использованием реактива на основе 3,5-динитросалициловой кислоты (Panreac, Испания) [16].

Обработка опытных данных включала расчет констант в кинетических закономерностях, полученных на базе математической модели фрактальной кинетики. Проверка воспроизводимости экспериментальных результатов осуществлялась по критерию Кохрена [17]. Каждая экспериментальная точка для всех образцов была получена при одинаковом числе параллельных измерений, которое было равно трем. В результате проверки установлено, что все опытные данные воспроизводимы, так как расчетные значения критерия Кохрена были меньше критических.

Проведенное исследование было выполнено с использованием приборной базы Бийского регионального центра коллективного пользования СО РАН (Институт проблем химико-энергетических технологий СО РАН, г. Бийск, Россия).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Химический состав мискантуса и субстратов из него приведен в табл. 1. Одностадийная предварительная обработка мискантуса гигантского позволяет повысить

¹ Оболенская А.В., Ельницкая З.П., Леонович А.А. Лабораторные работы по химии древесины и целлюлозы: учеб. пособие для студентов вузов. М.: Экология, 1991. 320 с.

² TAPPI T 222 om-02. Acid-insoluble lignin in wood and pulp. Atlanta: TAPPI Press, 2002.

³ TAPPI T 211 om-85. Ash in wood, pulp, paper, and paperboard. Atlanta: TAPPI Press, 1985.

содержание гидролизуемых веществ (целлюлозы и гемицеллюлоз) до 90,4–90,8%, то есть на 13,6–14,0% по сравнению с нативным мискантусом, а двухстадийная обработка позволяет повысить содержание гидролизуемых веществ до 98,3–99,4%, то есть на 7,5–9,0% по сравнению с одностадийной обработкой. При этом выход субстратов, полученных двухстадийно, на 10,0–18,0% ниже, чем выход субстратов, полученных одностадийно. Явление значительного снижения выхода при понижении доли нецеллюлозных компонентов в продуктах переработки (субстратах) закономерно и хорошо описано для разных видов целлюлозосодержащего сырья⁴.

Кроме режимов предварительной обработки химический состав субстратов зависит от природы целлюлозосодержащего сырья. В данной работе нами были применены авторские способы химической предварительной обработки мискантуса гигантского, проводимые при атмосферном давлении с использованием разбавленных растворов HNO₃ и NaOH. Ранее эти подходы были исследованы нами на мискантуса сахароцветного, справочно-химические составы мискантуса сахароцветного и субстратов из него также приведены в табл. 1 [18]. Химические составы мискантусов гигантского и сахароцветного близки. Отличия состоят в большей массовой доле целлюлозы для мискантуса гигантского по сравнению с мискантусом сахароцветным (54% против 50%) и в меньшей зольности (1,7% против 5,6%). Эти отличия объясняют получение больших выходов субстратов из мискантуса гигантского по сравнению с мискантусом сахароцветным: для одностадийно полученных субстратов – на 9–12%, для двухстадийно полученных субстратов – на 5,0–5,5%.

Химические составы субстратов из мискантуса гигантского и мискантуса сахароцветного, полученных идентичными методами, также близки. Тем не менее нами обнаружено принципиальное отличие в поведении мискантуса гигантского, а именно его устойчивость к щелочной делигнификации: при одностадийной обработке гидроксидом натрия содержание остаточного лигнина

в ПЩД мискантуса гигантского в 2,4 раза выше, чем в ПЩД мискантуса сахароцветного (9,0% против 3,8%). При этом в нативных мискантусах содержание лигнина находится на одном уровне около 21%.

Делигнификация с помощью NaOH – это классический промышленный метод предобработки травянистого целлюлозосодержащего сырья, но для древесного сырья он менее эффективен [19, 20]. На волокно лубяного сырья NaOH не оказывает воздействия, а костра лубяного сырья делигнифицируется весьма умеренно [21]. Основное воздействие щелочи на целлюлозосодержащее сырье заключается именно в делигнификации. Гидроксид натрия эффективно атакует связи между лигнином и гемицеллюлозами в лигнин-углеводных комплексах и расщепляет эфирные и сложноэфирные связи. Кроме того, NaOH эффективно расщепляет сложноэфирные и углерод-углеродные связи в молекулах лигнина. Эффективность щелочной делигнификации целлюлозосодержащего сырья зависит от его технологических режимов, а также от химического состава сырья и его морфологических особенностей [19].

Мискантус гигантский более устойчив к щелочной делигнификации, чем мискантус сахароцветный, благодаря своим морфологическим особенностям: это высокорослое, до 4 м высотой, растение с мощными стеблями толщиной до 2 см и крепкими междоузлиями. По прочности стебли мискантуса гигантского сравнимы с бамбуком, который, как и мискантус, относится к семейству злаковых. Мискантус сахароцветный может достигать высоты 3 м, но толщина стеблей составляет не более 0,8 см и после высушивания они напоминают стебли соломы.

Далее было исследовано поведение при ферментативном гидролизе четырех субстратов, полученных из мискантуса гигантского. В табл. 2 представлены средние значения экспериментальных данных по кинетике ферментативного гидролиза.

Известно, что кинетика ферментативного гидролиза целлюлозосодержащего сырья подчиняется классиче-

Таблица 1. Химический состав мискантуса и субстратов из него, %

Table 1. Chemical composition of miscanthus and substrates from it, %

Показатели	Сырье	Субстраты			
		ПАО	ПЩД	ЦАС	ЦМЩС
Мискантус гигантский (данная работа)					
Массовая доля целлюлозы	54,0±0,4	83,0±0,4	86,3±0,4	96,9±0,4	94,0±0,4
Массовая доля пентозанов	22,8±0,1	7,4±0,1	4,5±0,1	2,5±0,1	5,3±0,1
Массовая доля кислотонерастворимого лигнина	21,0±0,1	7,5±0,1	9,0±0,1	0,5±0,1	0,6±0,1
Массовая доля золы	1,7±0,01	2,1±0,01	0,19±0,01	0,12±0,01	0,06±0,01
Сумма гидролизуемых веществ	76,8±0,3	90,4±0,3	90,8±0,3	99,4±0,3	98,3±0,3
Выход из 100 кг сырья	–	50±0,1	48±0,1	32±0,1	38±0,1
Мискантус сахароцветный [18]					
Массовая доля целлюлозы	50,3±0,4	79,2±0,4	86,5±0,4	95,8±0,4	92,6±0,4
Массовая доля пентозанов	22,7±0,1	7,0±0,1	9,4±0,1	2,5±0,1	6,4±0,1
Массовая доля кислотонерастворимого лигнина	21,4±0,1	9,6±0,1	3,8±0,1	1,5±0,1	0,6±0,1
Массовая доля золы	5,6±0,01	4,2±0,01	0,3±0,01	0,2±0,01	0,4±0,01
Сумма гидролизуемых веществ	72,3±0,3	86,2±0,3	96,0±0,3	98,3±0,3	98,0±0,3
Выход из 100 кг сырья	–	37,7±0,1	39,0±0,1	24,6±0,1	33,4±0,1

⁴Технология целлюлозно-бумажного производства: справ. материалы. В 3 т. Т. 1. Ч. 1. СПб.: Изд-во ЛТА, 2002. 420 с.

Таблица 2. Средние значения экспериментальных данных по кинетике ферментативного гидролиза (приведены концентрации редуцирующих сахаров, г/л)

Table 2. Average values of experimental data on the kinetics of enzymatic hydrolysis (the concentrations of reducing sugars are given, g/l)

Образец	Начальная концентрация субстрата, г/л	Продолжительность гидролиза, ч					
		8	24	32	48	56	72
ПАО	30	12,2±0,2	18,5±0,5	19,0±0,5	21,5±0,5	21,5±0,5	21,5±0,5
	60	19,8±0,5	33,0±0,5	33,5±0,5	36,8±0,5	39,0±0,5	39,5±0,5
	90	27,5±0,5	49,5±0,5	51,0±1,0	55,0±1,0	58,5±1,0	59,0±1,0
	120	37,5±0,5	55,0±1,0	58,5±1,0	67,5±1,0	68,5±1,0	68,5±1,0
ПДЩ	30	10,0±0,2	17,0±0,2	19,1±0,2	19,8±0,5	20,2±0,5	20,2±0,5
	60	18,3±0,2	31,0±0,5	34,0±0,5	35,2±0,5	37,0±0,5	37,3±0,5
	90	25,8±0,5	42,0±0,5	48,5±0,5	53,5±1,0	55,0±1,0	55,0±1,0
	120	33,8±0,5	53,0±1,0	57,3±0,5	63,4±1,0	64,2±1,0	64,0±1,0
ЦАС	30	12,8±0,2	17,5±0,2	18,5±0,2	20,0±0,5	21,0±0,5	21,0±0,5
	60	22,8±0,5	30,5±0,5	32,8±0,5	36,5±0,5	39,0±0,5	39,0±0,5
	90	32,0±0,5	48,2±0,5	50,0±0,5	53,0±1,0	57,5±1,0	57,5±1,0
	120	41,3±0,5	54,0±0,5	58,0±1,0	67,5±1,0	67,5±1,0	67,5±1,0
ЦМЩС	30	13,0±0,2	17,5±0,2	20,0±0,5	20,5±0,5	21,0±0,5	21,0±0,5
	60	23,0±0,5	31,0±0,5	36,2±0,5	38,0±0,5	38,5±0,5	38,5±0,5
	90	31,8±0,5	49,5±0,5	50,5±1,0	52,0±1,0	53,5±1,0	56,5±1,0
	120	40,0±0,5	60,5±1,0	65,0±1,0	66,0±1,0	66,5±1,0	66,5±1,0

скому уравнению Михаэлиса – Ментен [22, 23]. Это уравнение справедливо для идеальных условий, когда используются химически чистые вещества и перемешивание реагентов осуществляется в гомогенной среде. В реальных условиях твердая фаза субстрата имеет многокомпонентную по химическому составу фрактальную структуру. Это означает, что структуры субстратов обладают свойством самоподобия, когда объект в точности или приближенно совпадает с частью себя самого или, другими словами, целое имеет ту же форму, что и одна или более его частей. В высококонцентрированных средах затруднен массо- и теплообмен. В связи с этим для описания кинетики ферментативного гидролиза субстратов с такой фрактальной структурой использование классических уравнений реакций первого порядка приводит к расхождениям между экспериментальными и теоретическими результатами [24].

По данной причине для описания процесса ферментативного гидролиза наиболее пригодной является математическая модель, полученная на уравнениях реакций псевдопервого порядка [25, 26]. При построении подобной математической модели предполагается, что различные гидролитические ферменты оказывают единое влияние на расщепление нерастворимых субстратов [27, 28]. В таком случае кинетика ферментативного гидролиза для всех субстратов может быть описана уравнением псевдопервого порядка реакции, имеющим вид

$$C(t) = C_m[1 - \exp(-k \times t^a)], \quad (1)$$

где $C(t)$ – мгновенная концентрация РС, кг/м³; C_m – предельная (максимальная теоретическая) концентрация РС для конкретного субстрата, г/л; k – константа, характеризующая скорость процесса гидролиза, ч⁻¹; a – фрактальная константа, характеризующая степень реакции ферментативного гидролиза.

Выражение (1) использовалось при построении кинетических закономерностей для всех опытных образцов. При этом исходили из следующих предположений:

- изменение концентрации РС от продолжительности процесса при ферментативном гидролизе подчиняется экспоненциальному закону;
- используемые субстраты существенно отличаются по исходному химическому составу;
- равномерность распределения ферментативного препарата по объему субстрата не контролировалась, что может оказывать существенное влияние на кинетику процесса.

Для вычисления записанных в выражении (1) констант данные табл. 2 были линеаризованы. В результате этого исходное выражение (1) было приведено к виду

$$y = ax + b, \quad (2)$$

где $y = \ln \{ \ln [C/(C-C_m)] \}$; $a = a$; $x = \ln(t)$; $b = \ln(k)$.

Значение параметра C_m принималось равным величине максимальной возможной концентрации РС, которая определялась индивидуально для каждого субстрата.

В результате выполнения процедуры линеаризации исходных экспериментальных данных и их обратного преобразования были вычислены коэффициенты, входящие в выражение (1). Результаты расчета коэффициентов сведены в табл. 3, куда также были записаны значения коэффициентов детерминации R^2 для всех видов субстратов. Высокие значения R^2 (более 0,91), наблюдаемые во всех экспериментах, указывают на эффективность фрактальной кинетической модели при описании ферментативного гидролиза различных типов субстратов.

Все полученные зависимости, описывающие поведение кинетики ферментативного гидролиза по выражению (1), с учетом коэффициентов, записанных в табл. 3, подтвердили свою адекватность по критерию Фишера при уровне значимости 0,05.

Таблица 3. Значения констант математической модели для четырех субстратов

Table 3. Values of mathematical model constants for four substrates

Образец	Начальная концентрация субстрата, г/л	Константы			R ²	Начальная скорость, г/(л×ч)
		C _m , г/л	k, ч ⁻¹	a		
ПАО	30	21,9	0,140	0,82	0,95	2,86
	60	40,3	0,129	0,79	0,98	4,87
	90	60,1	0,092	0,87	0,95	5,27
	120	69,9	0,124	0,83	0,95	8,18
ПЩД	30	20,6	0,101	0,91	0,99	1,97
	60	38,0	0,118	0,83	0,98	4,23
	90	56,1	0,094	0,87	0,99	5,03
	120	65,4	0,113	0,87	0,99	7,01
ЦАС	30	21,4	0,201	0,69	0,96	3,89
	60	39,8	0,165	0,73	0,92	6,05
	90	59,7	0,163	0,74	0,95	8,83
	120	68,9	0,172	0,75	0,91	10,90
ЦМЩС	30	21,4	0,213	0,70	0,97	4,12
	60	39,3	0,179	0,74	0,96	6,43
	90	57,6	0,217	0,65	0,95	11,25
	120	67,8	0,224	0,71	0,98	13,62

Расчет скорости реакции ферментативного гидролиза в любой момент времени должен осуществляться с учетом предложенного уравнения (1) по выражению

$$\frac{dC(t)}{dt} = C_m \times k \times a \times t^{a-1} \times \exp(-kt^a). \quad (3)$$

В то же время вычисление начальной скорости реакции для всех образцов аналитическим способом невозможно. Это связано с тем, что при $t = 0$ для $a < 1$ выражение $dC/dt \rightarrow \infty$.

По этой причине расчет начальной скорости реакции ферментативного гидролиза осуществлялся по формуле

$$\frac{\Delta C}{\Delta t} = \frac{C_{\text{теор.}}(1) - C_{\text{теор.}}(0)}{1 - 0}, \quad (4)$$

где $C_{\text{теор.}}(1)$ – теоретически вычисленное по выражению (1) с использованием коэффициентов табл. 3 значение концентрации РС при $t = 1$ ч от начала процесса ферментативного гидролиза, г/л; $C_{\text{теор.}}(0) = 0$ – начальная концентрация РС в момент времени $t = 0$, г/л.

Данные по расчету начальной скорости процесса ферментативного гидролиза по формуле (4) также были внесены в табл. 3.

Константа, характеризующая скорость процесса гидролиза, k зависит и от вида предобработки, и от начальной концентрации субстрата. Для субстратов, полученных двустадийно (ЦАС и ЦМЩС), константа скорости гидролиза выше, чем для субстратов, полученных одностадийно (ПАО и ПЩД), в 1,6–1,8 раза: 0,163–0,224 ч⁻¹ против 0,092–0,140 ч⁻¹, что объясняется химической чистотой двустадийно полученных субстратов. Поведение субстратов, полученных с помощью кислоты или щелочи на первой стадии, принципиально отличается при повышении начальной концентрации субстрата. Так, субстраты, полученные с использованием HNO₃ на первой стадии предобработки (ПАО и ЦАС), при повышении начальной концентрации субстрата демонстрируют небольшое снижение константы k : на 11,4% ПАО и на 14,4% ЦАС, в то время как субстраты, полученные с

использованием NaOH на первой стадии предобработки (ПЩД и ЦМЩС), напротив, при повышении начальной концентрации субстрата демонстрируют небольшое повышение константы k : на 11,9% ПЩД и на 5,2% ЦМЩС.

Как было показано в работе [29], константа скорости k в основном связана с реакционной способностью предварительно обработанного субстрата образовывать комплекс с целлюлазами. Постепенное снижение константы скорости k при увеличении начальной концентрации субстрата связано с рядом явлений, таких как ингибирование и дезактивация ферментов, затрудненность массопереноса из-за повышенного содержания твердого вещества [14]. Щелочная делигнификация приводит к образованию очень рыхлых субстратов [3], поэтому в указанном диапазоне начальных концентраций не наблюдается снижения k для субстратов ПЩД и ЦМЩС. В целом важно поддерживать баланс между высокой начальной концентрацией субстрата с целью увеличения концентрации РС в растворе и высокой скоростью ферментативного гидролиза с целью получения высоких выходов РС.

Фрактальная константа a отражает влияние предварительной обработки на структуру и доступность лигноцеллюлозы. Принято считать, что более низкие значения a характеризуют более доступные к действию ферментов субстраты, характеризующиеся, в свою очередь, аморфной структурой и быстрым массопереносом [30]. В целом коэффициент скорости k больше связан с доступностью целлюлозы в начальный момент ферментативного гидролиза, а фрактальный показатель a – с доступностью целлюлозы для воздействия ферментов в процессе ферментативного гидролиза [27].

В данной работе двустадийно предобработанные субстраты демонстрируют значения a ниже в 1,2 раза, чем одностадийно предобработанные субстраты (0,65–0,75 против 0,79–0,91). Это представляется обоснованным, так как при двустадийной обработке в субстратах меньше нецеллюлозных примесей и целлюлоза более доступна для взаимодействия с ферментами.

Увеличение начальных концентраций субстрата не оказывает существенного влияния на фрактальную константу a . Это связано с тем, что в течение первых двух часов ферментативного гидролиза происходит быстрое снижение кажущейся вязкости и предела текучести суспензии субстрата, суспензия разжижается и переходит в жидкое состояние [31]. Из-за быстрого разжижения фрактальная константа a , свидетельствующая о доступности целлюлозы при гидролизе, существенно не зависит от концентрации субстрата. Обе константы используют для оценки характеристик гидролиза различных видов предобработки биомассы. В работе [27] сравнение константы скорости k и фрактальной константы a при различных начальных концентрациях субстратов показало, что увеличение начальной концентрации субстрата значительно снижает доступность целлюлозы на начальной стадии гидролиза, не влияя при этом на доступность целлюлозы во время гидролиза. В нашем случае получены похожие закономерности.

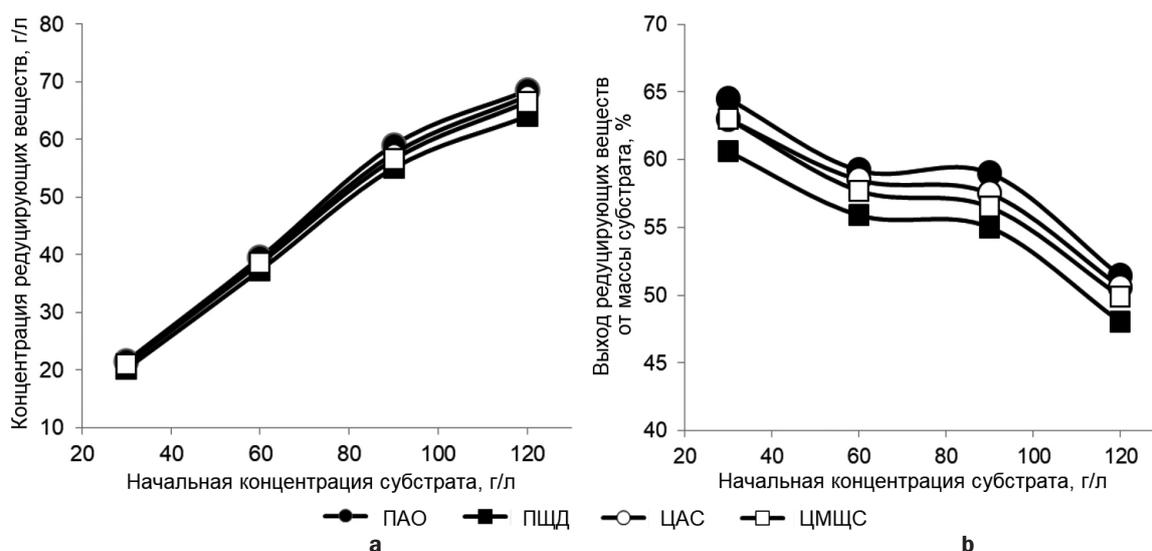
Наглядно особенности ферментативного гидролиза любых субстратов характеризует начальная скорость гидролиза (см. табл. 3). Двустадийно предобработанные субстраты демонстрируют более высокие скорости гидролиза, чем одностадийно предобработанные, и в исследуемом диапазоне начальных концентраций от 30 до 120 г/л изучаемые субстраты по начальной скорости гидролиза можно расположить в ряд: ЦМЩС > ЦАС > ПАО > ПЩД. Для всех субстратов характерно повышение начальной скорости гидролиза при повышении начальной концентрации субстрата: для ПАО в 2,9 раза, для ПЩД в 3,6 раза, для ЦАС в 2,8 раза, для ЦМЩС в 3,3 раза.

Главным критерием эффективности ферментативного гидролиза является не скорость гидролиза, а выход РС от массы субстрата [14, 22, 32]. Для всех субстратов при повышении начальной концентрации субстрата наблюдается повышение предельной концентрации C_m , что закономерно. Однако при увеличении C_m наблю-

дается снижение выхода РС. По выходу РС изучаемые субстраты можно расположить в следующий ряд: ПАО > ЦАС > ЦМЩС > ПЩД. Несколько сниженный выход РС для ПЩД (на 4–7% по сравнению с лидером) объясняется недостаточной делигнификацией мискантуса гигантского в выбранных условиях предобработки. Таким образом, для определения эффективности ферментативного гидролиза важно выполнить эксперимент до конца, не ограничиваясь анализом только начальной скорости гидролиза.

Нативный мискантус гигантский при концентрации субстрата 30 г/л обеспечивает концентрацию РС через 72 ч ферментативного гидролиза 0,6 г/л, что соответствует выходу РС 1,8%. Предобработка обеспечивает существенное повышение реакционной способности к ферментативному гидролизу в 34–36 раз (выход РС составляет 61% для ПЩД и 65% для ПАО). Это очень хороший результат, указывающий на высокую эффективность примененных предобработок. Согласно данным мировой литературы, предобработка считается эффективной, если она позволяет повысить реакционную способность к ферментативному гидролизу в 5–7 раз [3].

Снижение выхода РС при повышении начальной концентрации субстрата является неизбежным негативным эффектом. На рисунке показана зависимость концентрации и выхода РС по окончании ферментативного гидролиза от начальной концентрации субстратов, полученных из мискантуса гигантского. Для всех субстратов выход РС резко снижается от 62–65 до 58–59% при повышении начальной концентрации субстрата от 30 до 60 г/л. В диапазоне от 60 до 90 г/л выход РС стабильно сохраняется на уровне 56–59%, а при дальнейшем повышении начальной концентрации субстрата до 120 г/л резко падает до 49–52%. В целом при повышении начальной концентрации субстратов от 30 до 120 г/л выход РС уменьшается на 12,4–13,1%. Таким образом, диапазон от 60 до 90 г/л вполне приемлем для дальнейшей биотехнологической трансформации в биотоплива и биохимикаты.



Зависимость концентрации (а) и выхода (б) редуцирующих веществ по окончании ферментативного гидролиза от начальной концентрации субстратов

Dependence of concentration (a) and reducing substances yield (b) at the end of enzymatic hydrolysis on the initial concentration of substrates

Показательной является принципиальная разница при ферментативном гидролизе в поведении субстратов, полученных из мискантуса гигантского, в данной работе и в поведении субстратов, полученных из мискантуса сахароцветного, описанном нами ранее в работе [18]. Через 72 ч ферментативного гидролиза при начальной концентрации субстрата 30 г/л были получены следующие выходы РС в расчете на массу субстрата [18]: нативный мискантус сахароцветный – 11,1%; ПАО – 80,5%, ПЩД – 79,9%, ЦАС – 72,1%; ЦМЩС – 81,0%. Таким образом, снижение выхода РС для субстратов из мискантуса гигантского по сравнению с выходом РС для субстратов из мискантуса сахароцветного составило 11,1–15,5%. При этом реакционная способность к ферментативному гидролизу нативного мискантуса гигантского в 6,2 раза ниже, чем нативного мискантуса сахароцветного (выход РС 1,8% против 11,1% соответственно). В работах применены идентичные методы предобработки, разница состояла только в использовании разных видов сырья одного и того же биологического вида. Морфологические особенности сырья оказались определяющими для поведения субстратов при ферментативном гидролизе. Природа сырья такова, что мискантус гигантский более устойчив к физико-химическому и ферментативному воздействиям, чем мискантус сахароцветный. Устойчивость нельзя считать недостатком мискантуса гигантского, так как именно она определяет успешность его применения в целлюлозно-бумажной промышленности, строительстве, энергетике.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из мискантуса гигантского сорта КАМИС российской селекции с применением авторских методов химической предобработки, реализуемых при атмосферном давлении с использованием разбавленных растворов HNO₃ и NaOH, получено четыре субстрата. Установлено, что одностадийная обработка мискантуса гигантского приводит к повышению содержания гидролизуемых

веществ в субстратах до 90,4–90,8%, что на 13,6–14,0% выше по сравнению с нативным мискантусом, а двухстадийная обработка приводит к повышению содержания гидролизуемых веществ до 98,3–99,4%, что на 7,5–9,0% выше по сравнению с одностадийной обработкой. При этом выход субстратов, полученных двухстадийно, на 10,0–18,0% ниже, чем субстратов, полученных одностадийно.

В результате исследования ферментативного гидролиза полученных субстратов и математической обработки опытных данных установлено, что для субстратов, полученных двухстадийно, константа, характеризующая скорость процесса гидролиза, в 1,6–1,8 раза выше, а константа фрактальности в 1,2 раза ниже, чем для субстратов, полученных одностадийно. При повышении начальной концентрации субстрата от 30 до 120 г/л для всех субстратов наблюдается снижение выхода РС на 12,4–13,1% при повышении начальной скорости гидролиза в 2,8–3,3 раза.

Нативный мискантус характеризуется высокой устойчивостью к ферментативному гидролизу, выход РС от массы субстрата составляет всего 1,8%. Авторская предобработка привела к повышению реакционной способности субстратов к ферментативному гидролизу в 34–36 раз по сравнению с нативным сырьем, что является выдающимся результатом. Самые высокие выходы РС получены при одностадийной обработке мискантуса гигантского разбавленным раствором HNO₃. Сниженные выходы РС наблюдаются при ферментативном гидролизе продукта щелочной делигнификации мискантуса гигантского, что связано с устойчивостью данного вида сырья к обработке гидроксидом натрия.

Ферментативный гидролиз высококонцентрированных субстратов может успешно использоваться для получения биотоплив и биохимикатов, так как повышение начальной концентрации субстратов до 90 г/л не приводит к существенному снижению выхода РС.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Wagh M.S., Sowjanya S., Nath P.C., Chakraborty A., Amrit R., Mishra B., et al. Valorisation of agro-industrial wastes: circular bioeconomy and biorefinery process – a sustainable symphony // *Process Safety and Environmental Protection*. 2024. Vol. 183. P. 708–725. DOI: 10.1016/j.psep.2024.01.055.
2. Mohammad R.E.A., Abdullahi S.S.A., Muhammed H.A., Musa H., Habibu S., Jagaba A.H., et al. Recent technical and non-technical biorefinery development barriers and potential solutions for a sustainable environment: a mini-review // *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*. 2024. Vol. 9. P. 100586. DOI: 10.1016/j.csee.2023.100586.
3. Zabed H., Sahu J.N., Boyce A.N., Faruq G. Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: an overview on feedstocks and technological approaches // *Renewable & Sustainable Energy Reviews*. 2016. Vol. 66. P. 751–774. DOI: 10.1016/j.rser.2016.08.038.
4. Ha D.T., Kanarsky A.V., Kanarskaya Z.A., Shcherbakov A.V., Shcherbakova E.N., Pranovich A.V. Impact of cultivation conditions on xylanase production and growth in *Paenibacillus mucilaginosus* // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2020. Т. 10. N 3. С. 459–469. DOI: 10.21285/2227-2925-2020-10-3-459-469. EDN: OMLQLP.
5. Хоанг К.К., Евстафьев С.Н. Оптимизация процесса обработки ультразвуком соломы пшеницы в среде хлорида 1-бутил-3-метилимидазолия // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2017. Т. 7. N 2. С. 105–112. DOI: 10.21285/2227-2925-2017-7-2-105-112. EDN: YTPLTV.
6. Boakye-Boaten N.A., Kurkalova L., Xiu S., Shahbazi A. Techno-economic analysis for the biochemical conversion of *Miscanthus x giganteus* into bioethanol // *Biomass and Bioenergy*. 2017. Vol. 98. P. 85–94. DOI: 10.1016/j.biombioe.2017.01.017.
7. Zhang Y., Oates L.G., Serate J., Xie D., Pohlmann E., Bukhman Y.V., et al. Diverse lignocellulosic feedstocks can achieve high field-scale ethanol yields while providing flexibility for the biorefinery and landscape-level environmental benefits // *Global Change Biology Bioenergy*. 2018. Vol. 10, no. 11. P. 825–840. DOI: 10.1111/gcbb.12533.
8. Shavyrkina N.A., Budaeva V.V., Skiba E.A., Gismatulina Y.A., Sakovich G.V. Review of Current Prospects for Using *Miscanthus*-Based Polymers // *Polymers*. 2023. Vol. 15, no. 14. P. 3097. DOI: 10.3390/polym15143097.
9. Mironova G.F., Budaeva V.V., Skiba E.A., Gismatulina Y.A., Kashcheyeva E.I., Sakovich G.V. Recent advances in *Miscanthus* macromolecule conversion: a brief overview //

International Journal of Molecular Sciences. 2023. Vol. 24, no. 16. P. 13001. DOI: 10.3390/ijms241613001.

10. Sebastian J., Rouissi T., Brar S.K. *Miscanthus* sp. – perennial lignocellulosic biomass as feedstock for greener fumaric acid bioproduction // *Industrial Crops and Products*. 2022. Vol. 175. P. 114248. DOI: 10.1016/j.indcrop.2021.114248.

11. Alvira P., Tomás-Pejó E., Ballesteros M., Negro M.J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review // *Bioresource Technology*. 2010. Vol. 101, no. 13. P. 4851–4861. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.11.093.

12. Agrawal R., Satlewal A., Gaur R., Mathur A., Kumar R., Gupta R.P., et al. Pilot scale pretreatment of wheat straw and comparative evaluation of commercial enzyme preparations for biomass saccharification and fermentation // *Biochemical Engineering Journal*. 2015. Vol. 102. P. 54–61. DOI: 10.1016/j.bej.2015.02.018.

13. Kadhum H.J., Mahapatra D.M., Murthy G.S. A comparative account of glucose yields and bioethanol production from separate and simultaneous saccharification and fermentation processes at high solids loading with variable PEG concentration // *Bioresource Technology*. 2019. Vol. 283. P. 67–75. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.03.060.

14. Sun C., Meng X., Sun F., Zhang J., Tu M., Chang J.-S., et al. Advances and perspectives on mass transfer and enzymatic hydrolysis in the enzyme-mediated lignocellulosic biorefinery: a review // *Biotechnology Advances*. 2023. Vol. 62. P. 108059. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2022.108059.

15. Kurschner K., Hoffer A. Cellulose and cellulose derivative // *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*. 1993. Vol. 92, no. 3. P. 145–154.

16. Miller G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar // *Analytical Chemistry*. 1959. Vol. 31, no. 3. P. 426–428. DOI: 10.1021/ac60147a030.

17. Cochran W.G. The comparison of percentages in matched samples // *Biometrika*. 1950. Vol. 37, no. 3-4. P. 256–266. DOI: 10.1093/biomet/37.3-4.256.

18. Kashcheyeva E.I., Gismatulina Y.A., Budaeva V.V. Pretreatments of non-woody cellulosic feedstocks for bacterial cellulose synthesis // *Polymers*. 2019. Vol. 11, no. 10. P. 1645. DOI: 10.3390/polym11101645.

19. Kim J.S., Lee Y.Y., Kim T.H. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass // *Bioresource Technology*. 2016. Vol. 199. P. 42–48. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.08.085.

20. Chaudhary G., Chaudhary N., Saini S., Gupta Y., Vivekanand V., Panghal A. Assessment of pretreatment strategies for valorization of lignocellulosic biomass: path forwarding towards lignocellulosic biorefinery // *Waste and Biomass Valorization*. 2024. Vol. 15, no. 1. P. 1–36. DOI: 10.1007/s12649-023-02219-z.

21. Корчагина А.А., Гладышева Е.К., Будаева В.В., Скиба Е.А. Химический состав волокна и костры лубяных культур и продуктов их щелочной делигнификации // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*.

2023. Т. 13. N 4. С. 621–630. DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-621-630. EDN: KSVUTY.

22. Baksi S., Sarkar U., Villa R., Basu D., Sengupta D. Conversion of biomass to biofuels through sugar platform: a review of enzymatic hydrolysis highlighting the trade-off between product and substrate inhibitions // *Sustainable Energy Technologies and Assessments*. 2023. Vol. 55. P. 102963. DOI: 10.1016/j.seta.2022.102963.

23. Harun R., Danquah M.K. Enzymatic hydrolysis of microalgal biomass for bioethanol production // *Chemical Engineering Journal*. 2011. Vol. 168, no. 3. P. 1079–1084. DOI: 10.1016/j.cej.2011.01.088.

24. Pahari S., Kim J., Choi H.-K., Zhang M., Ji A., Yoo C.G., et al. Multiscale kinetic modeling of biomass fractionation in an experiment: understanding individual reaction mechanisms and cellulose degradation // *Chemical Engineering Journal*. 2023. Vol. 467. P. 143021. DOI: 10.1016/j.cej.2023.143021.

25. Xu F., Ding H. A new kinetic model for heterogeneous (or spatially confined) enzymatic catalysis: contributions from the fractal and jamming (overcrowding) effects // *Applied Catalysis A: General*. 2007. Vol. 317, no. 1. P. 70–81. DOI: 10.1016/j.apcata.2006.10.014.

26. Wojtusik M., Zurita M., Villar J.C., Ladero M., Garcia-Ochoa F. Enzymatic saccharification of acid pretreated corn stover: empirical and fractal kinetic modelling // *Bioresource Technology*. 2016. Vol. 220 P. 110–116. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.08.069.

27. Li H., Zhai R., Chen X., Jiang X., Li C., Deng Q., et al. Modeling and design of fed-batch strategies for achieving 255 g/L sugar concentration from high-solid enzymatic hydrolysis of pretreated corn stover // *Chemical Engineering Journal*. 2024. Vol. 486. P. 150268. DOI: 10.1016/j.cej.2024.150268.

28. Fockink D.H., Urio M.B., Sánchez J.H., Ramos L.P. Enzymatic hydrolysis of steam-treated sugarcane bagasse: effect of enzyme loading and substrate total solids on its fractal kinetic modeling and rheological properties // *Energy & Fuels*. 2017. Vol. 31, no. 6. P. 6211–6220. DOI: 10.1021/acs.energyfuels.7b00818.

29. Bansal P., Hall M., Realf M.J., Lee J.H., Bommaris A.S. Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates // *Biotechnology Advances*. 2009. Vol. 27, no. 6. P. 833–848. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2009.06.005.

30. Wang Z., Feng H. Fractal kinetic analysis of the enzymatic saccharification of cellulose under different conditions // *Bioresource Technology*. 2010. Vol. 101, no. 20. P. 7995–8000. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.05.056.

31. Lu M., Li J., Han L., Xiao W. High-solids enzymatic hydrolysis of ballmilled corn Stover with reduced slurry viscosity and improved sugar yields // *Biotechnology for Biofuels*. 2020. Vol. 13, no. 1. P. 77. DOI: 10.1186/s13068-020-01717-9.

32. Sinitsyn A.P., Sinitsyna O.A. Bioconversion of renewable plant biomass. Second-generation biofuels: raw materials, biomass pretreatment, enzymes, processes, and cost analysis // *Biochemistry (Moscow)*. 2021. Vol. 86. P. S166–S195. DOI: 10.1134/S0006297921140121.

REFERENCES

1. Wagh M.S., Sowjanya S., Nath P.C., Chakraborty A., Amrit R., Mishra B., et al. Valorisation of agro-industrial wastes: circular bioeconomy and biorefinery process – a sustainable symphony. *Process Safety and Environmental Protection*. 2024;183:708-725. DOI: 10.1016/j.psep.2024.01.055.

2. Mohammad R.E.A., Abdullahi S.S.A., Muhammed H.A., Musa H., Habibu S., Jagaba A.H., et al. Recent technical and non-technical biorefinery development barriers and potential solutions for a sustainable environment: a mini-review. *Case Studies in Chemical and Environmental*

- Engineering*. 2024;9:100586. DOI: 10.1016/j.cscee.2023.100586.
- 3.** Zabed H., Sahu J.N., Boyce A.N., Faruq G. Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: an overview on feedstocks and technological approaches. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*. 2016;66:751-774. DOI: 10.1016/j.rser.2016.08.038.
- 4.** Ha D.T., Kanarsky A.V., Kanarskaya Z.A., Shcherbakov A.V., Shcherbakova E.N., Pranovich A.V. Impact of cultivation conditions on xylanase production and growth in *Paenibacillus mucilaginosus*. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2020;10(3):459-469. DOI: 10.21285/2227-2925-2020-10-3-459-469. EDN: OMLQLP.
- 5.** Hoang Q.C., Evstaf'ev S.N. Optimization of wheat straw ultrasound processing in the environment of 1-butyl-3-methylimidazolium chloride. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2017;7(2):105-112. (In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2017-7-2-105-112. EDN: YTPLTV.
- 6.** Boakye-Boaten N.A., Kurkalova L., Xiu S., Shahbazi A. Techno-economic analysis for the biochemical conversion of *Miscanthus x giganteus* into bioethanol. *Biomass and Bioenergy*. 2017;98:85-94. DOI: 10.1016/j.biombioe.2017.01.017.
- 7.** Zhang Y., Oates L.G., Serate J., Xie D., Pohlmann E., Bukhman Y.V., et al. Diverse lignocellulosic feedstocks can achieve high field-scale ethanol yields while providing flexibility for the biorefinery and landscape-level environmental benefits. *Global Change Biology Bioenergy*. 2018;10(11):825-840. DOI: 10.1111/gcbb.12533.
- 8.** Shavyrkina N.A.; Budaeva V.V.; Skiba E.A.; Gismatulina Y.A.; Sakovich G.V. Review of Current Prospects for Using *Miscanthus*-Based Polymers. *Polymers*. 2023;15(14):3097. DOI: 10.3390/polym15143097.
- 9.** Mironova G.F., Budaeva V.V., Skiba E.A., Gismatulina Y.A., Kashcheyeva E.I., Sakovich G.V. Recent advances in *Miscanthus* macromolecule conversion: a brief overview. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(16):13001. DOI: 10.3390/ijms241613001.
- 10.** Sebastian J., Rouissi T., Brar S.K. *Miscanthus* sp. – perennial lignocellulosic biomass as feedstock for greener fumaric acid bioproduction. *Industrial Crops and Products*. 2022;175:114248. DOI: 10.1016/j.indcrop.2021.114248.
- 11.** Alvira P., Tomás-Pejó E., Ballesteros M., Negro M.J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. *Bioresource Technology*. 2010;101(13):4851-4861. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.11.093.
- 12.** Agrawal R., Satlewal A., Gaur R., Mathur A., Kumar R., Gupta R.P., et al. Pilot scale pretreatment of wheat straw and comparative evaluation of commercial enzyme preparations for biomass saccharification and fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 2015;102:54-61. DOI: 10.1016/j.bej.2015.02.018.
- 13.** Kadhum H.J., Mahapatra D.M., Murthy G.S. A comparative account of glucose yields and bioethanol production from separate and simultaneous saccharification and fermentation processes at high solids loading with variable PEG concentration. *Bioresource Technology*. 2019;283:67-75. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.03.060.
- 14.** Sun C., Meng X., Sun F., Zhang J., Tu M., Chang J.-S., et al. Advances and perspectives on mass transfer and enzymatic hydrolysis in the enzyme-mediated lignocellulosic biorefinery: a review. *Biotechnology Advances*. 2023;62:108059. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2022.108059.
- 15.** Kurschner K., Hoffer A. Cellulose and cellulose derivative. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*. 1993;92(3):145-154.
- 16.** Miller G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 1959;31(3):426-428. DOI: 10.1021/ac60147a030.
- 17.** Cochran W.G. The comparison of percentages in matched samples. *Biometrika*. 1950;37(3-4):256-266. DOI: 10.1093/biomet/37.3-4.256.
- 18.** Kashcheyeva E.I., Gismatulina Y.A., Budaeva V.V. Pretreatments of non-woody cellulosic feedstocks for bacterial cellulose synthesis. *Polymers*. 2019;11(10):1645. DOI: 10.3390/polym11101645.
- 19.** Kim J.S., Lee Y.Y., Kim T.H. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. 2016;199:42-48. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.08.085.
- 20.** Chaudhary G., Chaudhary N., Saini S., Gupta Y., Vivekanand V., Panghal A. Assessment of pretreatment strategies for valorization of lignocellulosic biomass: path forwarding towards lignocellulosic biorefinery. *Waste and Biomass Valorization*. 2024;15(1):1-36. DOI: 10.1007/s12649-023-02219-z.
- 21.** Korchagina A.A., Gladysheva E.K., Budaeva V.V., Skiba E.A. Chemical composition of fiber and shive in bast-fiber crops and the products of their alkaline delignification. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2023;13(4):621-630. (In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-621-630. EDN: KSVUTY.
- 22.** Baksi S., Sarkar U., Villa R., Basu D., Sengupta D. Conversion of biomass to biofuels through sugar platform: a review of enzymatic hydrolysis highlighting the trade-off between product and substrate inhibitions. *Sustainable Energy Technologies and Assessments*. 2023;55:102963. DOI: 10.1016/j.seta.2022.102963.
- 23.** Harun R., Danquah M.K. Enzymatic hydrolysis of microalgal biomass for bioethanol production. *Chemical Engineering Journal*. 2011;168(3):1079-1084. DOI: 10.1016/j.cej.2011.01.088.
- 24.** Pahari S., Kim J., Choi H.-K., Zhang M., Ji A., Yoo C.G., et al. Multiscale kinetic modeling of biomass fractionation in an experiment: understanding individual reaction mechanisms and cellulose degradation. *Chemical Engineering Journal*. 2023;467:143021. DOI: 10.1016/j.cej.2023.143021.
- 25.** Xu F., Ding H. A new kinetic model for heterogeneous (or spatially confined) enzymatic catalysis: contributions from the fractal and jamming (overcrowding) effects. *Applied Catalysis A: General*. 2007;317(1):70-81. DOI: 10.1016/j.apcata.2006.10.014.
- 26.** Wojtusik M., Zurita M., Villar J.C., Ladero M., Garcia-Ochoa F. Enzymatic saccharification of acid pretreated corn stover: empirical and fractal kinetic modelling. *Bioresource Technology*. 2016;220:110-116. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.08.069.
- 27.** Li H., Zhai R., Chen X., Jiang X., Li C., Deng Q., et al. Modeling and design of fed-batch strategies for achieving 255 g/L sugar concentration from high-solid enzymatic hydrolysis of pretreated corn stover. *Chemical Engineering Journal*. 2024; 486:150268. DOI: 10.1016/j.cej.2024.150268.

28. Fockink D.H., Urio M.B., Sánchez J.H., Ramos L.P. Enzymatic hydrolysis of steamtreated sugarcane bagasse: effect of enzyme loading and substrate total solids on its fractal kinetic modeling and rheological properties. *Energy & Fuels*. 2017;31(6):6211-6220. DOI: 10.1021/acs.energyfuels.7b00818.

29. Bansal P., Hall M., Realf M.J., Lee J.H., Bommaris A.S. Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates. *Biotechnology Advances*. 2009;27(6):833-848. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2009.06.005.

30. Wang Z., Feng H. Fractal kinetic analysis of the enzymatic saccharification of cellulose under different

conditions. *Bioresource Technology*. 2010;101(20):7995-8000. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.05.056.

31. Lu M., Li J., Han L., Xiao W. High-solids enzymatic hydrolysis of ballmilled corn Stover with reduced slurry viscosity and improved sugar yields. *Biotechnology for Biofuels*. 2020;13(1):77. DOI: 10.1186/s13068-020-01717-9.

32. Sinitsyn A.P., Sinitsyna O.A. Bioconversion of renewable plant biomass. Second-generation biofuels: raw materials, biomass pretreatment, enzymes, processes, and cost analysis. *Biochemistry (Moscow)*. 2021;86:S166-S195. DOI: 10.1134/S0006297921140121.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Скиба Екатерина Анатольевна,

д.т.н., доцент, ведущий научный сотрудник,
Институт проблем химико-энергетических
технологий СО РАН,
659322, г. Бийск, ул. Социалистическая, 1,
Российская Федерация,
✉ eas08988@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-8897-347X>

Кашеева Екатерина Ивановна,

к.т.н., старший научный сотрудник,
Институт проблем химико-энергетических
технологий СО РАН,
659322, г. Бийск, ул. Социалистическая, 1,
Российская Федерация,
massl@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-1593-7982>

Золотухин Владимир Николаевич,

к.т.н., старший научный сотрудник,
Институт проблем химико-энергетических
технологий СО РАН,
659322, г. Бийск, ул. Социалистическая, 1,
Российская Федерация,
zolutukhin_vn@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-9630-6332>

Кухленко Алексей Анатольевич,

к.т.н., ведущий инженер,
АО «Специальное конструкторско-
технологическое бюро "Катализатор"»,
630058, г. Новосибирск, ул. Тихая, 1,
Российская Федерация,
ak-79@rambler.ru
<https://orcid.org/0000-0003-3088-1198>

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Ekaterina A. Skiba,

Dr. Sci. (Engineering), Associate Professor,
Leading Researcher,
Institute for Problems of Chemical
and Energetic Technologies SB RAS,
1, Sotsialisticheskaya St., Biysk, 659322,
Russian Federation,
✉ eas08988@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-8897-347X>

Ekaterina I. Kashcheyeva,

Cand. Sci. (Engineering), Senior Researcher,
Institute for Problems of Chemical
and Energetic Technologies SB RAS,
1, Sotsialisticheskaya St., Biysk, 659322,
Russian Federation,
massl@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-1593-7982>

Vladimir N. Zolutukhin,

Cand. Sci. (Engineering), Senior Researcher,
Institute for Problems of Chemical
and Energetic Technologies SB RAS,
1, Sotsialisticheskaya St., Biysk, 659322,
Russian Federation,
zolutukhin_vn@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-9630-6332>

Alexey A. Kukhlenko,

Cand. Sci. (Engineering), Lead Engineer,
Joint Stock Company "Special Design and Technology
Bureau 'Catalyst'",
1, Tikhaya St., Novosibirsk, 630058,
Russian Federation,
ak-79@rambler.ru
<https://orcid.org/0000-0003-3088-1198>

Вклад авторов

Е.А. Скиба – формальный анализ, обсуждение результатов, написание текста статьи.
Е.И. Кашеева – разработка концепции исследования, методология экспериментов, проведение экспериментов, обсуждение результатов.
В.Н. Золотухин – проведение экспериментов, обсуждение результатов.
А.А. Кухленко – обработка полученных данных, обсуждение результатов, редактирование текста статьи.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Информация о статье

Поступила в редакцию 25.06.2024.
Одобрена после рецензирования 29.08.2024.
Принята к публикации 30.08.2024.

Contribution of the authors

Ekaterina A. Skiba – formal analysis, results discussion, writing the text of manuscript.
Ekaterina I. Kashcheyeva – research concept development, methodology of experiments, experimentation, result discussion.
Vladimir N. Zolotukhin – experimentation, result discussion.
Alexey A. Kukhlenko – data processing, result discussion, text editing.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

The final manuscript has been read and approved by all the co-authors.

Information about the article

The article was submitted 25.06.2024.
Approved after reviewing 29.08.2024.
Accepted for publication 30.08.2024.