

Научная статья
УДК 664.162.036.4:577.15
EDN: BJADRE
DOI: 10.21285/achb.990



Сравнительная оценка ферментных препаратов для конверсии предобработанной шелухи овса

Е.И. Кашеева✉, В.В. Будаева, В.Н. Золотухин

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

Аннотация. Ферментативный гидролиз предварительно обработанного лигноцеллюлозного сырья с целью получения сбраживаемых сахаров является одним из критических этапов в технологии производства продуктов биосинтеза с добавленной стоимостью. В данной работе проводилась сравнительная оценка ферментных препаратов и композиций на их основе для конверсии продукта азотнокислой обработки шелухи овса. Гидролиз осуществлялся при начальной концентрации субстрата 30 г/л, pH 4,7 и температуре (46 ± 2) °C. Сравнительной оценке подвергались три ферментных препарата, полученные от разных производителей: «Агроцелл плюс» (ООО «Агрофермент», Россия), «Целлолюкс-А» (ООО ПО «Сиббиофарм», Россия), «Ультрафло Макс» (Novozymes A/S, Дания). Путем сравнения эффективности индивидуальных ферментных препаратов установлено, что выход редуцирующих веществ от массы субстрата составляет 53, 40 и 51% соответственно. Добавление к ферментным препаратам «Агроцелл Плюс» или «Целлолюкс-А» с высокой целлюлазной активностью дополнительной β -глюканазы («Ультрафло Макс») приводит к увеличению выхода редуцирующих веществ в 1,3–1,5 раза. Максимальный выход редуцирующих веществ 72%, что соответствует 99% гидролиза доступной части субстрата, наблюдается при гидролизе композицией из трех ферментных препаратов. Методом растровой электронной микроскопии субстрата до и после гидролиза подтверждена эффективность применения композиций и установлено различие между остатками фрагментированного субстрата после гидролиза индивидуальными препаратами и мультиэнзимными композициями в пользу последних. Все полученные гидролизаты продукта азотнокислой обработки шелухи овса характеризуются как глюкозные: вклад глюкозы в общую концентрацию редуцирующих веществ составляет 85–91%, что позволяет предположить их успешное использование для биосинтеза.

Ключевые слова: шелуха овса, кислотная предварительная обработка, ферментативный гидролиз, мультиэнзимная композиция

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Минобрнауки в рамках госзадания ИПХЭТ СО РАН (код научной темы FUFЕ-2024-0008, регистрационный номер 124021200031-4).

Для цитирования: Кашеева Е.И., Будаева В.В., Золотухин В.Н. Сравнительная оценка ферментных препаратов для конверсии предобработанной шелухи овса // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2025. Т. 15. N 3. С. 347–356. DOI: 10.21285/achb.990. EDN: BJADRE.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Comparative evaluation of enzyme cocktails for conversion of pretreated oat hulls

Ekaterina I. Kashcheyeva✉, Vera V. Budaeva, Vladimir N. Zolotukhin

Institute for Problems of Chemical and Energetic Technologies, Siberian Branch
of the Russian Academy of Sciences, Biysk, Russian Federation

Abstract. The enzymatic hydrolysis of pretreated lignocellulosic feedstock is a critical step in the production of value-added biosynthesis products. This work presents a comparative evaluation of commercial enzyme prepara-

tions and their combinations for converting oat hulls following nitric acid pretreatment. Hydrolysis was carried out at an initial substrate concentration of 30 g/L, pH 4.7, and a temperature of (46 ± 2) °C. The study evaluated three enzyme preparations from different manufacturers, including Agrocell Plus (Agroferment LLC, Russia), Cellolux-A (Sibbiofarm LLC, Russia), and Ultraflo Max (Novozymes A/S, Denmark). The evaluation of the individual preparations revealed that the yield of reducing substances from the substrate mass was 53%, 40%, and 51%, respectively. The addition of supplementary β -glucanase (Ultraflo Max) to the enzyme preparations Agrocell Plus or Cellolux-A, which exhibit high cellulase activity, resulted in a 1.3–1.5-fold increase in reducing substance yield. The maximum yield of reducing substances of 72%, corresponding to 99% hydrolysis of the available substrate portion, was observed during hydrolysis using a combination of all three enzyme preparations. Scanning electron microscopy of the substrate before and after hydrolysis confirmed the effectiveness of the mixed preparations and revealed a difference in the residual fragmented substrate after hydrolysis by the individual preparations versus the multi-enzyme compositions, in favor of the latter. All hydrolysates obtained from the nitric acid-pretreated oat hulls were characterized as glucose-based, with the total concentration of glucose amounting to 85–91%. This composition suggests a high potential for successful use in subsequent biosynthesis processes.

Keywords: oat hulls, acid pretreatment, enzymatic hydrolysis, multi-enzyme composition

Funding. The Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation supported the study under project no. FUFЕ-2024-0008 (Theme Registration ID: 124021200031-4).

For citation: Kashcheyeva E.I., Budaeva V.V., Zolotukhin V.N. Comparative evaluation of enzyme cocktails for conversion of pretreated oat hulls. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2025;15(3):347-356. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.990. EDN: BJADRE.

ВВЕДЕНИЕ

Лигноцеллюлозное сырье (ЛЦС) является самым распространенным и дешевым ресурсом в мире [1]. Продукция, полученная из ЛЦС, имеет большой потенциал для замены продуктов, получаемых из ископаемых видов топлива, тем самым играя ключевую роль в переходе к биоэкономике [2, 3]. Конверсия ЛЦС имеет решающее значение для глобального углеродного цикла, поскольку при ней происходит перенос значительного количества углерода из его фиксированного хранилища в атмосферу [4]. Однако разработка эффективного, экономически выгодного и экологически безопасного процесса максимальной переработки компонентов ЛЦС в полезные продукты, позволяющего полностью использовать компоненты сырья и при этом предотвращать образование нежелательных побочных продуктов, остается сложной задачей [5, 6]. Использование ферментов предлагает многообещающий путь при переработке ЛЦС из-за их высокой селективности при гидролизе полисахаридов сырья (целлюлозы и гемицеллюлоз) в простые сбраживаемые сахара, такие как глюкоза и ксилоза [2, 7]. Высокая степень конверсии лигноцеллюлозного субстрата может быть достигнута при использовании эффективных и толерантных ферментов при отсутствии их необратимого связывания с лигнином и ингибирования конечным продуктом. Тем не менее использование потенциала ЛЦС является сложной задачей из-за нескольких факторов: физико-химических, структурных, композиционных, ограничивающих процесс переработки природных полисахаридов [2].

Предварительная обработка, ферментативный гидролиз и сбраживание сахаров являются основными этапами переработки лигноцеллюлозной биомассы в моносахара и последующие продукты биосинтеза. Среди них предварительная обработка и стоимость фермента (или ферментативного гидролиза) считаются основными центрами затрат [8, 9]. Коммерческие целлюлазные ферментные препараты (ФП) содержат ряд гидролитических ферментов, включая целюлазы, гемицеллюлазы, эндоглюканазы и литические полисахарид-

монооксигеназы, которые разрушают разнообразные связи между функциональными группами полимеров в составе ЛЦС. Синергическое действие ферментов усиливает гидролиз субстрата. Таким образом, разработка высокоэффективных и недорогих ФП для гидролиза лигноцеллюлозы является одной из основных исследовательских платформ в области переработки ЛЦС [1].

Получение ФП, имеющего в своем составе три компонента целлюлазы (эндоглюканазы, целлобиогидролазы и β -глюкозидазы) в правильной пропорции для полного гидролиза целлюлозосодержащих субстратов, представляется сложной задачей. Использование мультиэнзимных композиций для гидролиза ЛЦС является ключом к эффективному процессу. Для получения максимального гидролиза субстрата (более 70%) необходимо использовать сбалансированную композицию целлюлолитических ферментов, которая может увеличить скорость гидролиза и уменьшить количество необходимых ферментов, следовательно, и снизить общую стоимость производства моносахаров [10, 11]. Существует три основные причины для разработки мультиэнзимной композиции: уменьшение количества необходимых для гидролиза ферментов, преобразование всех углеводов субстрата в сбраживаемые сахара в течение короткого промежутка времени и необходимость гидролиза при высокой начальной концентрации субстрата [12]. Самый простой способ получения высокоэффективной мультиэнзимной композиции – смешивание двух или трех ФП, полученных из разных источников (в основном грибы и бактерии), которые различаются по количеству и типу целлюлолитических ферментов. Такое смешивание позволяет увеличить степень гидролиза лигноцеллюлозного субстрата при меньшей концентрации белка или уровне FPU. Например, β -глюкозидаза из разных источников имеет разное предпочтение к целлоолигосахаридам и целлобиозе: некоторые β -глюкозидазы эффективны для гидролиза целлоолигосахаридов от C2 до C6, в то время как другие эффективно гидролизуют только сахара C2 [8]. Иногда нецеллюлолитические ферменты действуют как отличное дополнение и снижают

количество требуемой целлюлазы, а также ускоряют разжижение биомассы при высокой начальной концентрации субстрата. Авторы работы [13] сообщают, что гидролиз жома сахарного тростника увеличился при добавлении ксиланаз к целлюлазе, что уменьшило расход последней на 20% при замене на 20% ксиланаз. Кроме того, ксиланазы увеличивают эффективность гидролиза как целлюлозы, так и гемицеллюлоз вследствие нарушения взаимодействия лигнина и ксилана и, соответственно, удаления ксиланового покрытия [2].

В представленном исследовании проводилась сравнительная оценка ферментных препаратов, полученных от разных производителей, и композиций на их основе при конверсии предварительно обработанной шелухи овса.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве сырья в работе использовали шелуху овса (*Avena Sativa*), которая была предоставлена ООО «Диарит» (г. Тамбов, Россия). Субстрат для ферментативного гидролиза получали предварительной обработкой шелухи овса 4%-м раствором азотной кислоты в течение 6 ч. Продукт после азотнокислой обработки шелухи овса высушивали на воздухе для анализа химического состава и дальнейшего ферментативного гидролиза. Для гидролиза использовали три ФП, полученные от разных производителей: «Агроцелл плюс» (ООО «Агрофермент», Россия), «Целлолюкс-А» (ООО ПО «Сиббиофарм», Россия), «Ультрафло Макс» (Novozymes A/S, Дания). «Агроцелл плюс» и «Целлолюкс-А» характеризуются производителями как комплексные ФП, обладающие целлюлазной, ксиланазной и β -глюканазной активностями. «Ультрафло Макс» – двухкомпонентная смесь β -глюканазы и ксиланазы. Продукты и активности ФП представлены в табл. 1.

Таблица 1. Характеристики ферментных препаратов

Table 1. Characteristics of enzymes

Наименование препарата	Продуцент	Ферментативная активность, ед/г
Агроцелл плюс	<i>Penicillium verruculosum</i>	Целлюлазная 4000
		β -Глюканазная 3000
		Ксиланазная 400
Целлолюкс-А	<i>Trichoderma viride (reesei)</i>	Целлюлазная 2000
		β -Глюканазная 1500
		Ксиланазная 6000
Ультрафло Макс	<i>Aspergillus oryzae</i>	β -Глюканазная 700
	<i>Trichoderma reesei</i>	Ксиланазная 250

Влажность субстрата определяли на анализаторе влагосодержания MB 23 (Ohaus, США). Анализ химического состава субстрата проводили по общепринятым методам для анализа растительного сырья. Массовую долю целлюлозы по Кюршнеру определяли путем

экстракции смесью HNO_3 /спирт в соотношении 1:4 в течение 4 ч [14]. Массовую долю кислотонерастворимого лигнина оценивали в соответствии с методикой, описанной в TAPPI T 222¹. Массовую долю пентозанов определяли с использованием раствора орсида спектрофотометрическим способом на UNICO UV-2804 (United products and instruments, США)². Зольность оценивали путем сжигания образца в течение 3 ч при 600 °C³.

Исследование морфологии субстрата, а также непрореагировавших остатков после гидролиза проводилось методом растровой электронной микроскопии (РЭМ) с помощью прибора JSM-840 (Jeol, Япония) [15].

Сравнительную оценку гидролитических свойств ФП проводили на одном субстрате в идентичных условиях: загрузка твердых веществ 3%, скорость перемешивания 150 об/мин на горизонтальном перемешивающем устройстве ЭКРОС ПЭ-6410 («Экохим», Россия), температура (46±2) °C. Субстрат массой 4,5 г в пересчете на абсолютно сухое вещество вносили в коническую колбу объемом 0,5 л. Общий объем реакционной массы 0,15 л поддерживали добавлением 0,5 М ацетатного буфера (pH = 4,7). Для гидролиза продукта после азотнокислой обработки шелухи овса ФП использовали индивидуально, а также из них были составлены мультиэнзимные композиции, состав которых представлен в табл. 2 (опыты 4–7). ФП смешивали в массовом соотношении 1:1 (1:1:1) во всех возможных вариантах. Перед внесением ФП или композиции на их основе растворяли в ацетатном буфере. Процесс проводили при соотношении 20 мг фермента к 1 г субстрата или 0,6 мг фермента к 1 мл реакционной массы. Каждый эксперимент проводили в трех повторностях.

Таблица 2. Ферментные препараты и композиции на их основе

Table 2. Enzymes and compositions based on them

Номер опыта	Используемые ферментные препараты		
	Агроцелл плюс	Целлолюкс-А	Ультрафло Макс
1	+		
2		+	
3			+
4	+		+
5		+	+
6	+	+	
7	+	+	+

Через определенные промежутки времени отбирали пробы из гидролизатов, фильтровали и в фильтрате анализировали концентрации редуцирующих веществ (РВ) и глюкозы с помощью спектрофотометра Cary 60 UV-Vis (Agilent Technologies, США). Концентрацию РВ определяли в пересчете на глюкозу с использованием реактива на основе 3,5-динитросалициловой кислоты (Panreac, Испания) [16]. Концентрацию глюкозы определяли глюкозооксидазно-пероксидазным методом с помощью

¹TAPPI T 222 om-02. Acid-insoluble lignin in wood and pulp. Atlanta: TAPPI Press, 2002.

²Оболенская А.В., Ельницкая З.П., Леонович А.А. Лабораторные работы по химии древесины и целлюлозы: учеб. пособие. М.: Экология, 1991. 319 с.

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

реактивов из набора «Фотоглюкоза» (ООО «Импакт», Россия) [17]. Через 72 ч гидролиза суспензию фильтровали под вакуумом, в фильтрате анализировали концентрации РВ и глюкозы. По результатам анализа рассчитывались конечный выход РВ от массы субстрата (1) и гидролизующих компонентов (2), а также выход глюкозы от массы субстрата (1) и целлюлозы (3) по формулам:

$$\eta_c = \frac{C_K \times V}{m_c} \times 0,9 \times 100, \quad (1)$$

$$\eta_{ГК} = \frac{C_K \times V}{m_c \cdot (100 - Л - З)} \times 0,9 \times 100, \quad (2)$$

$$\eta_{ц} = \frac{C_K \times V}{m_c \times Ц} \times 0,9 \times 100, \quad (3)$$

где η_c – выход РВ (глюкозы) от массы субстрата, %; $\eta_{ГК}$ – выход РВ от содержания гидролизующих компонентов в субстрате, %; $\eta_{ц}$ – выход глюкозы от содержания целлюлозы в субстрате, %; C_K – конечная концентрация РВ (глюкозы) в гидролизате, г/л; V – объем гидролизата, л; 0,90 – коэффициент, обусловленный присоединением молекулы воды к ангидаглюкозным остаткам соответствующих мономерных звеньев в результате ферментативного гидролиза; m_c – масса субстрата для ферментативного гидролиза, г; $Л$ – массовая доля остаточного лигнина в субстрате, %; $З$ – массовая доля золы в субстрате, %; $Ц$ – массовая доля целлюлозы в субстрате, %.

Работа была выполнена с использованием приборной базы Бийского регионального центра коллективного пользования СО РАН.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Химический состав шелухи овса и продукта после ее азотнокислой обработки приведен в табл. 3. Содержание целлюлозы после предварительной обработки увеличилось на 25% по сравнению с исходным сырьем. Практически все гемицеллюлозы гидролизировались в процессе обработки, что привело к уменьшению их массовой доли на 24%. При этом массовая доля лигнина в субстрате после обработки значительно не умень-

шилась и составила 17,1%, что всего на 4,6% ниже, чем в исходной шелухе овса.

Таблица 3. Химический состав шелухи овса до и после обработки разбавленным раствором азотной кислоты

Table 3. Chemical composition of oat hulls before and after treatment with a dilute nitric acid solution

Показатель	Шелуха овса	Продукт после азотнокислой обработки
Массовая доля целлюлозы, %	40,8±0,4	66,1±0,4
Массовая доля пентозанов, %	31,0±0,1	6,8±0,1
Массовая доля кислотонерастворимого лигнина, %	21,7±0,1	17,1±0,1
Массовая доля золы, %	5,5±0,01	9,7±0,01

Далее проводили сравнительную оценку ФП и композиций на их основе для конверсии предварительно обработанной шелухи овса. В табл. 4 приведены характеристики гидролизатов через 72 ч.

На основе сравнения эффективности индивидуальных ФП установлено (см. табл. 4, опыты № 1–3), что максимальная степень конверсии субстрата наблюдается при использовании ФП «Агроцелл плюс» и «Ультрафло Макс»: выход РВ в обоих случаях в 1,3 раза выше, чем при гидролизе с использованием ФП «Целлолюкс-А». «Агроцелл плюс» характеризуется максимальными активностями (см. табл. 1), что и объясняет полученные результаты (выход РВ от массы субстрата – 53%). Неожиданно высокая степень конверсии субстрата демонстрируется при использовании «Ультрафло Макс» (выход РВ от массы субстрата – 51%), так как препарат позиционируется как β -глюканаза. Это объясняется тем, что помимо ферментов, заявленных в паспорте (β -глюканаза и ксиланаза), препарат дополнительно обладает достаточно высокой целлюлазной активностью.

Использование индивидуальных ФП с различным содержанием гидролитических ферментов позволяет достичь 54–72% конверсии доступной части субстрата

Таблица 4. Характеристики гидролизатов через 72 ч

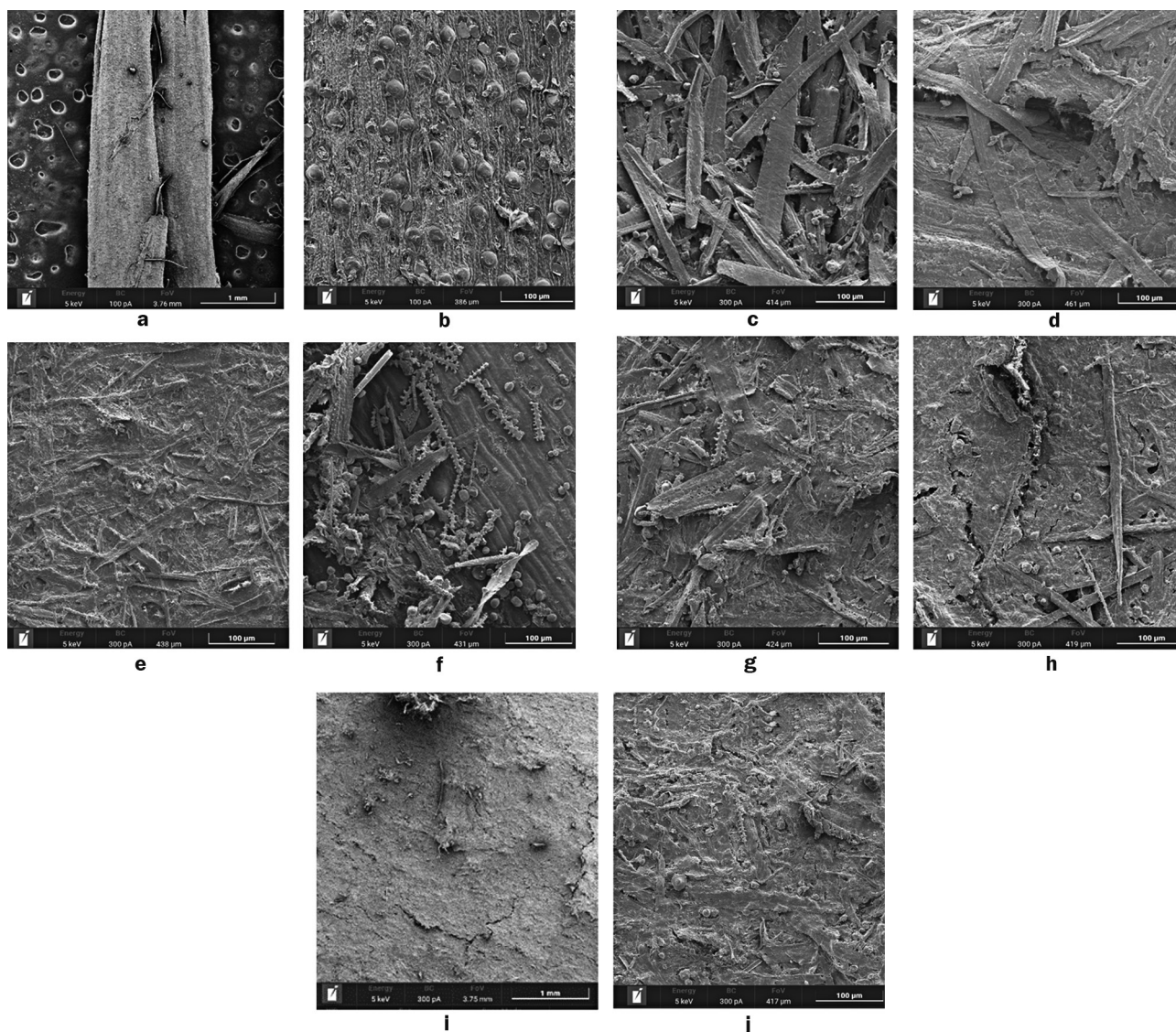
Table 4. Characteristics of hydrolysates after 72 hours of hydrolysis

Характеристика гидролизата	Номер опыта						
	1	2	3	4	5	6	7
Редуцирующие вещества:							
концентрация, г/л	17,6±0,5	13,2±0,5	16,9±0,5	23,7±0,5	19,3±0,5	23,6±0,5	24,1±0,5
выход от массы субстрата, %	53±2	40±2	51±2	71±2	58±2	71±2	72±2
выход от содержания гидролизующих компонентов, %	72±2	54±2	69±2	97±2	79±2	97±2	99±2
Глюкоза:							
концентрация, г/л	15,5±0,8	11,9±0,8	14,4±0,8	21,2±0,8	16,9±0,8	20,9±0,8	22,0±0,8
выход от массы субстрата, %	46±3	36±3	43±3	64±3	51±3	63±3	66±3
выход от содержания целлюлозы, %	70±3	54±3	65±3	96±3	77±3	95±3	100±3
Концентрация пентоз, г/л	1,9±0,2	1,7±0,2	2,0±0,2	2,3±0,2	1,7±0,2	2,2±0,2	2,3±0,2

(целлюлоза и гемицеллюлозы), что демонстрирует необходимость использования композиций на основе этих препаратов (см. табл. 4, опыты № 4–7). Добавление к ФП «Агроцелл Плюс» и «Целлолюкс-А», обладающим высокой целлюлазной активностью, дополнительной β -глюканазы («Ультрафло Макс») приводит к увеличению выхода РВ в пересчете на массу субстрата в случае «Агроцелл плюс» в 1,3 раза, в случае «Целлолюкс-А» в 1,5 раза.

Смешивание ФП «Агроцелл плюс» с «Целлолюкс-А» или «Ультрафло Макс» приводит к практически полному гидролизу доступной части субстрата в опытах № 4 и 6 соответственно: выход РВ от массовой доли гидролизуемых компонентов в обоих случаях составил 97%. Это

свидетельствует о том, что ферментативная система препарата «Агроцелл плюс» является основной, а два других фермента усиливают ее действие [2]. Максимальный выход РВ (72% от массы субстрата) наблюдается при ферментативном гидролизе композицией из трех ФП (опыт № 7). Смешивание трех ФП, полученных из разных источников, позволяет получить мультиэнзимную композицию, которая гидролизует всю доступную часть субстрата: выход РВ от массовой доли гидролизуемых компонентов составил 99%. Это объясняется тем, что ФП, имеющие в составе одни и те же ферменты, но разное происхождение, работают синергически, усиливая положительные характеристики друг друга и тем самым увеличивая эффективность гидролиза [8]. Исполь-



Сделанное при помощи растрового электронного микроскопа фото продукта после азотной обработки шелухи овса и остатков после его ферментативного гидролиза различными ферментными препаратами: а – субстрат ($\times 50$); б – субстрат ($\times 500$); в – опыт № 1 ($\times 500$); д – опыт № 2 ($\times 500$); е – опыт № 3 ($\times 500$); ф – опыт № 4 ($\times 500$); г – опыт № 5 ($\times 500$); h – опыт № 6 ($\times 500$); i – опыт № 7 ($\times 50$); j – опыт № 7 ($\times 500$)

Scanning electron microscope photo of the product after nitric acid treatment of oat hulls and residues after its enzymatic hydrolysis with various enzymes: а – substrate ($\times 50$); б – substrate ($\times 500$); в – experiment no. 1 ($\times 500$); д – experiment no. 2 ($\times 500$); е – experiment no. 3 ($\times 500$); ф – experiment no. 4 ($\times 500$); г – experiment no. 5 ($\times 500$); h – experiment no. 6 ($\times 500$); i – experiment no. 7 ($\times 50$); j – experiment no. 7 ($\times 500$)

зование мультиэнзимных композиций с превосходной каталитической активностью является единственным решением для обеспечения стабильности в практическом биокатализе [18].

Концентрация глюкозы и ксилозы позволяет характеризовать полученные гидролизаты как глюкозные: вклад глюкозы в общую концентрацию РВ составил 85–91%, вклад пентоз – 9–12%.

Результаты исследования РЭМ субстрата до и после гидролиза (рисунок) позволили получить удивительные сведения о превращениях лигноцеллюлозных частиц при воздействии ферментов, особенно при сравнении воздействия индивидуальных ферментов и композиций на их основе.

Субстрат при увеличении в 50 и 500 раз (см. рисунок) представляет собой крупные плоские волокна разного размера и фибриллы с толщиной в диапазоне 0,02–0,20 мкм. Крупные волокна имеют неровную поверхность, на которой можно рассмотреть петельчатые участки, трещины, поры и выпуклости правильной формы. Можно предположить, что выпуклости являются кремневыми образованиями, которые проявились в процессе азотнокислой обработки шелухи овса. Форма волокон обусловлена особой морфологией тонких чешуек лигноцеллюлозы, многослойно покрывающих зерно для защиты от атмосферных осадков. Специфичность формы волокон субстрата не позволяет сравнить полученные результаты РЭМ с опубликованными данными в связи с их отсутствием. Известно, что неоднородность поверхности, а именно наличие на волокнах шероховатостей и пор, способствует более быстрому проникновению целлюлаз внутрь субстрата [19].

После гидролиза ФП «Агроцелл плюс» (опыт № 1) цельный субстрат фрагментируется в более мелкие плоские волокна лентообразной формы с неровными краями шириной 10–40 мкм и длиной 200–700 мкм. Фрагментация частиц субстрата сопровождается высвобождением кремневых образований в виде шаров неправильной формы диаметром 10–20 мкм и гребенчатых структур с зазубренными краями шириной 2–10 мкм и длиной до 100 мкм. Появление кремневых образований обосновано накоплением в твердой фазе лигнина и золы, поскольку в процессе гидролиза целлюлоза и гемицеллюлозы переходят в жидкую фазу в виде глюкозы, целлобиозы и растворимых олигосахаридов. Подобные явления визуализации процесса ферментативного гидролиза, а именно высвобождение отдельных частиц из цельного субстрата при действии ферментов, описаны авторами работ [20, 21].

В отличие от опыта № 1 остаток субстрата после гидролиза ФП «Целлолюкс-А» (опыт № 2) фрагментировался в меньшей степени, поскольку наблюдаются более крупные волокна с гипертрофированной поверхностью после воздействия фермента только по поверхности субстрата. Наличие лентообразных волокон и мелких частиц двух различных форм (шары неправильной формы и гребенчатые структуры) подтверждают поверхностный характер воздействия ферментов. После гидролиза ФП «Ультрафло Макс» (опыт № 3) субстрат претерпел более эффективную фрагментацию с образованием очень мелких частиц, среди которых с трудом, но можно идентифицировать волокна различной длины и формы (присутствуют и трубки), лежащие плотным слоем. Сравнение

микрофотографий остатков субстрата после гидролиза индивидуальными ФП показывает различную степень воздействия ферментов, причем результаты в опыте № 2 уступают результатам опытов № 1 и 3.

Гидролиз композицией из ФП «Агроцелл плюс» и «Ультрафло Макс» (опыт № 4) превращает субстрат в удивительное многообразие форм частиц, среди которых плоские закрученные ленты, трубки, шарообразные и гребенчатые кремневые образования присутствуют примерно в равных долях, что подтверждает максимальную из представленных выше опытов фрагментацию. Необходимо подчеркнуть, что наличие в композиции ФП «Ультрафло Макс», аналогично опыту № 3, приводит к образованию в остатке субстрата трубчатых волокон, а также впервые наблюдаются отверстия в плоских волокнах и значительная деформация краев этих волокон.

В сравнении с предыдущим опытом композиция из ФП «Агроцелл плюс» и «Целлолюкс-А» (опыт № 5) гораздо слабее воздействует на субстрат, потому что в остатке наблюдаются исключительно крупные волокна, но размер частиц свидетельствует о более эффективной фрагментации, чем в опытах с индивидуальными ФП. Значительное улучшение в сравнении с опытом № 5 наблюдается при воздействии на субстрат композиции из ФП «Целлолюкс-А» и «Ультрафло Макс» (опыт № 6), поскольку остатки частиц сложно идентифицировать и они образуют плотный слой высушенной взвеси.

Использование композиции из трех ФП (опыт № 7) приводит к практически полному гидролизу доступной части субстрата, в результате которого остается однородная аморфная масса из очень мелких частиц различной формы, среди которых при увеличении можно рассмотреть шары неправильной формы и гребенчатые структуры, характерные для кремневых образований. Это явление понятно, поскольку минеральные компоненты, которые не гидролизуются, должны накапливаться в процессе ферментативного гидролиза в твердом остатке. В связи с этим идея получения биогенного кремнезема через ферментативный гидролиз целлюлозосодержащего сырья и сжигание остатка субстрата по-прежнему остается актуальной [22, 23]. Поскольку ценность биогенного кремнезема многократно доказана [24, 25], применение мультиэнзимных композиций в гидролизе предобработанной шелухи овса позволяет кроме глюкозного гидролизата с концентрацией 22 г/л получить еще один полезный продукт – аморфный оксид кремния.

Обобщая результаты визуализации гидролиза, необходимо отметить, что в большинстве случаев остатки субстрата после гидролиза представлены неупорядоченной смесью мелких частей волокон и кремневых образований. При использовании индивидуальных ФП в остатках присутствуют более крупные части волокон, а при использовании мультиэнзимных композиций остаток представлен аморфной массой только из мелких частей волокон и кремневых образований – тем самым подтверждается эффективность использования композиций ФП. По результатам анализа опубликованных данных визуализации ферментативного гидролиза примеры воздействия композиций ФП на субстраты ранее не были описаны. Полученные в данных исследованиях результаты хорошо согласуются с высокими значениями

выходов РВ от массы субстрата и гидролизующих компонентов для опытов № 4, 6 и 7.

Логическим продолжением данных исследований является масштабирование ферментативного гидролиза и использование более высоких начальных концентраций субстрата, поскольку известно, что выход РВ находится в обратной зависимости от концентрации субстрата. Например, авторы исследования [26] смогли получить выход РВ от массы субстрата всего 14% при начальной концентрации предварительно обработанной гидроксидом натрия лузги подсолнечника 200 г/л, несмотря на применение композиции из четырех ФП: «Целло-Люкс-А», «β-Глюканаза-Ц/А», «Целлюлаза», «Ксиланаза». Возможность получения других ценных продуктов, кроме глюкозного гидролизата, таких как аморфный диоксид кремния, может оправдать снижение выхода целевой глюкозы при использовании высокоэффективной мульти-энзимной композиции в промышленном биокатализе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате сравнительной оценки ФП для конверсии предобработанной шелухи овса установлено, что можно максимизировать высвобождение РВ до 97–99% в процессе гидролиза путем использования мультиэнзимных композиций. По сравнению с результатами, полученными при использовании индивидуальных ФП, применение композиций привело к увеличению эффективности гидролиза на 19–32% в случае РВ и на 20–30% в случае глюкозы. Полученные гидролизаты характеризуются как преимущественно глюкозные (вклад глюкозы – 85–91%), что подтверждает возможность их дальнейшего использования для получения продуктов биосинтеза с высокой добавленной стоимостью. Результаты РЭМ остатков субстрата после ферментативного гидролиза визуализируют высокую эффективность композиций на основе ФП.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Tuan L., Anne-Archard D., Cameleyre X., Lombard E., To K.A., Pham T.A., et al. Rheological investigation of complex lignocellulosic suspensions during hydrolysis using pure and cocktail of enzymes // *Bioresource Technology*. 2025. Vol. 426. P. 132333. DOI: 10.1016/j.biortech.2025.132333.
2. Moya E.B., Syhler B., Dragone G., Mussatto S.I. Tailoring a cellulolytic enzyme cocktail for efficient hydrolysis of mildly pretreated lignocellulosic biomass // *Enzyme and Microbial Technology*. 2024. Vol. 175. P. 110403. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2024.110403.
3. Yamakawa C.K., Qin F., Mussatto S.I. Advances and opportunities in biomass conversion technologies and biorefineries for the development of a bio-based economy // *Biomass and Bioenergy*. 2018. Vol. 119. P. 54–60. DOI: 10.1016/j.biombioe.2018.09.007.
4. Liang C., Long Y., Wang W., Zhang Y., Xing S., Chen Z., et al. Correlation and synergy between fungal secretome cellulolytic enzyme cocktails and commercial cellulase for woody biomass degradation // *Renewable Energy*. 2025. Vol. 240. P. 122158. DOI: 10.1016/j.renene.2024.122158.
5. Semenova M.V., Rozhkova A.M., Osipov D.O., Telitsin V.D., Rubtsova E.A., Kondrat'eva E.G., et al. Methods for preprocessing reeds to obtain enzymatic hydrolysates with a high sugar content // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2024. Vol. 60. P. 931–941. DOI: 10.1134/S0003683824604736.
6. Mankar A.R., Pandey A., Modak A., Pant K.K. Pretreatment of lignocellulosic biomass: a review on recent advances // *Bioresource Technology*. 2021. Vol. 334. P. 125235. DOI: 10.1016/j.biortech.2021.125235.
7. Петухова О.С., Приставка А.А., Приставка Е.А., Гавриков Д.Е., Саловарова В.П. Сравнительный анализ структурно-функциональных особенностей эндоглюканаз с разным температурным оптимумом действия // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2024. Т. 14. N 4. С. 596–604. DOI: 10.21285/achb.946. EDN: SRPVFQ.
8. Adsul M., Sandhu S.K., Singhanian R.R., Gupta R., Puri S.K., Mathur A. Designing a cellulolytic enzyme cocktail for the efficient and economical conversion of lignocellulosic biomass to biofuels // *Enzyme and Microbial Technology*. 2020. Vol. 133. P. 109442. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2019.109442.
9. 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.
10. Soleimani S., Ranaei-Siadat S.-O., Preparation and optimization of cellulose cocktail to improve the bioethanol process // *Biofuels*. 2017. Vol. 8, no. 2. P. 291–296. DOI: 10.1080/17597269.2016.1224293.
11. Shevchenko A.R., Mayorova K.A., Chukhchin D.G., Malkov A.V., Toptunov E.A., Telitsin V. D., et al. Enzymatic hydrolysis of kraft and sulfite pulps: what is the best cellulosic substrate for industrial saccharification? // *Fermentation*. 2023. Vol. 9, no. 11. P. 936. DOI: 10.3390/fermentation9110936.
12. Сербя Е.М., Римарева Л.В., Оверченко М.Б., Игнатова Н.И., Медриш М.Э., Павлова А.А. [и др.]. Подбор мультиэнзимной композиции и условий подготовки концентрированного зернового сусла // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2021. Т. 11. N 3. С. 384–392. DOI: 10.21285/2227-2925-2021-11-3-384-392. EDN: YEIIIV.
13. Li J., Zhou P., Liu H., Xiong C., Lin J., Xiao W., et al. Synergism of cellulase, xylanase, and pectinase on hydrolyzing sugarcane bagasse resulting from different pretreatment technologies // *Bioresource Technology*. 2014. Vol. 155. P. 258–265. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.12.113.
14. Kurschner K., Hoffer A. Cellulose and cellulose derivative // *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*. 1993. Vol. 92. P. 145–154.
15. Pavlov I.N. A setup for studying the biocatalytic conversion of products from the processing of nonwood raw materials // *Catalysis in Industry*. 2014. Vol. 6. P. 355–360. DOI: 10.1134/S207005041404014X.
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. Dotsenko A., Gusakov A., Rozhkova A., Sinitsyna O., Shashkov I., Sinitsyn A. Enzymatic hydrolysis of cellulosic materials using synthetic mixtures of purified cellulases bioengineered at N-glycosylation sites // *3 Biotech*. 2018. Vol. 8. P. 396. DOI: 10.1007/s13205-018-1419-4.

18. Shi J., Wu Y., Zhang S., Tian Y., Yang D., Jiang Z. Bio-inspired construction of multi-enzyme catalytic systems // *Chemical Society Reviews*. 2018. Vol. 47, no. 12. P. 4295–4313. DOI: 10.1039/C7CS00914C.

19. Rohrbach J.C., Luterbacher J.S. Investigating the effects of substrate morphology and experimental conditions on the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass through modeling // *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*. 2021. Vol. 14. P. 103. DOI: 10.1186/s13068-021-01920-2.

20. Schläfle S., Tervahartiala T., Senn T., Kölling-Paternoga R. Quantitative and visual analysis of enzymatic lignocellulose degradation // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2017. Vol. 11. P. 42–49. DOI: 10.1016/j.bcab.2017.06.002.

21. Zeng M., Mosier N.S., Huang C.-P., Sherman D.M., Ladisch M.R. Microscopic examination of changes of plant cell structure in corn stover due to hot water pretreatment and enzymatic hydrolysis // *Biotechnology and Bioengineering*. 2007. Vol. 97, no. 2. P. 265–278. DOI: 10.1002/bit.21298.

22. Земнухова Л.А., Скиба Е.А., Будаева В.В., Панасенко А.Е., Полякова Н.В. Состав неорганических компонентов шелухи овса и продуктов ее химической и

ферментативной трансформации // *Журнал прикладной химии*. 2018. Т. 91. N 2. С. 217–221. EDN: YRVLZF.

23. Kaur P., Singh S., Sharma N., Agrawal R. Filling in the gaps in second-generation biorefineries: evaluating rice straw and its bioethanol residue for the production of biogenic silica nanoparticles // *Nanotechnology for Environmental Engineering*. 2024. Vol. 9. P. 67–76. DOI: 10.1007/s41204-023-00351-8.

24. Zemnukhova L.A., Egorov A.G., Fedorishcheva G.A., Barinov N.N., Sokol'Nitskaya T.A., Botsul A.I. Properties of amorphous silica produced from rice and oat processing waste // *Inorganic Materials*. 2006. Vol. 42. P. 24–29. DOI: 10.1134/S0020168506010067.

25. Prempeh C.O., Formann S., Schliermann T., Dizaji H.B., Nelles M. Extraction and characterization of biogenic silica obtained from selected agro-waste in Africa // *Applied Sciences*. 2021. Vol. 11, no. 21. P. 10363. DOI: 10.3390/app112110363.

26. Вистовская В.П., Кожемякин Д.С., Каменская Е.П. Оптимизация параметров ферментализации подсолнечной лузги с использованием методов математического моделирования // *Ползуновский вестник*. 2025. N 1. С. 103–109. DOI: 10.25712/ASTU.2072-8921.2025.01.012. EDN: USIKBN.

REFERENCES

1. Tuan L., Anne-Archard D., Cameleyre X., Lombard E., To K.A., Pham T.A., et al. Rheological investigation of complex lignocellulosic suspensions during hydrolysis using pure and cocktail of enzymes. *Bioresource Technology*. 2025;426:132333. DOI: 10.1016/j.biortech.2025.132333.

2. Moya E.B., Syhler B., Dragone G., Mussatto S.I. Tailoring a cellulolytic enzyme cocktail for efficient hydrolysis of mildly pretreated lignocellulosic biomass. *Enzyme and Microbial Technology*. 2024;175:110403. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2024.110403.

3. Yamakawa C.K., Qin F., Mussatto S.I. Advances and opportunities in biomass conversion technologies and biorefineries for the development of a bio-based economy. *Biomass and Bioenergy*. 2018;119:54–60. DOI: 10.1016/j.biombioe.2018.09.007.

4. Liang C., Long Y., Wang W., Zhang Y., Xing S., Chen Z., et al. Correlation and synergy between fungal secretome cellulolytic enzyme cocktails and commercial cellulase for woody biomass degradation. *Renewable Energy*. 2025;240:122158. DOI: 10.1016/j.renene.2024.122158.

5. Semenova M.V., Rozhkova A.M., Osipov D.O., Telitsin V.D., Rubtsova E.A., Kondrat'eva E.G., et al. Methods for preprocessing reeds to obtain enzymatic hydrolysates with a high sugar content. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2024;60:931–941. DOI: 10.1134/S0003683824604736.

6. Mankar A.R., Pandey A., Modak A., Pant K.K. Pretreatment of lignocellulosic biomass: a review on recent advances. *Bioresource Technology*. 2021;334:125235. DOI: 10.1016/j.biortech.2021.125235.

7. Petukhova O.S., Pristavka A.A., Pristavka E.A., Gavrikov D.E., Salovarova V.P. Comparative analysis of the structural and functional features of endoglucanases with different temperature optima. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2024;14(4):596–604. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.946. EDN: SRPVFQ.

8. Adsul M., Sandhu S.K., Singhania R.R., Gupta R., Puri S.K., Mathur A. Designing a cellulolytic enzyme cocktail

for the efficient and economical conversion of lignocellulosic biomass to biofuels. *Enzyme and Microbial Technology*. 2020;133:109442. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2019.109442.

9. 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.

10. Soleimani S., Ranaei-Sadat S.-O., Preparation and optimization of cellulose cocktail to improve the bioethanol process. *Biofuels*. 2017;8(2):291–296. DOI: 10.1080/17597269.2016.1224293.

11. Shevchenko A.R., Mayorova K.A., Chukhchin D.G., Malkov A.V., Toptunov E.A., Telitsin V. D., et al. Enzymatic hydrolysis of kraft and sulfite pulps: what is the best cellulosic substrate for industrial saccharification? *Fermentation*. 2023;9(11):936. DOI: 10.3390/fermentation9110936.

12. Serba E.M., Rimareva L.V., Overchenko M.B., Ignatova N.I., Medrish M.E., Pavlova A.A., et al. Selecting multi-enzyme composition and preparation conditions for strong wort. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(3):384–392. (In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2021-11-3-384-392. EDN: YEIIZV.

13. Li J., Zhou P., Liu H., Xiong C., Lin J., Xiao W., et al. Synergism of cellulase, xylanase, and pectinase on hydrolyzing sugarcane bagasse resulting from different pretreatment technologies. *Bioresource Technology*. 2014;155:258–265. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.12.113.

14. Kurschner K., Hoffer A. Cellulose and cellulose derivative. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*. 1993;92:145–154.

15. Pavlov I.N. A setup for studying the biocatalytic conversion of products from the processing of nonwood raw materials. *Catalysis in Industry*. 2014;6:355–360. DOI: 10.1134/S207005041404014X.

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. Dotsenko A., Gusakov A., Rozhkova A., Sinitsyna O., Shashkov I., Sinitsyn A. Enzymatic hydrolysis of cellulosic materials using synthetic mixtures of purified cellulases bio-engineered at N-glycosylation sites. *3 Biotech*. 2018;8:396. DOI: 10.1007/s13205-018-1419-4.

18. Shi J., Wu Y., Zhang S., Tian Y., Yang D., Jiang Z. Bioinspired construction of multi-enzyme catalytic systems. *Chemical Society Reviews*. 2018;47(12):4295-4313. DOI: 10.1039/C7CS00914C.

19. Rohrbach J.C., Luterbacher J.S. Investigating the effects of substrate morphology and experimental conditions on the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass through modeling. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*. 2021;14:103. DOI: 10.1186/s13068-021-01920-2.

20. Schläfle S., Tervahartala T., Senn T., Kölling-Paternoga R. Quantitative and visual analysis of enzymatic lignocellulose degradation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2017;11:42-49. DOI: 10.1016/j.bcab.2017.06.002.

21. Zeng M., Mosier N.S., Huang C.-P., Sherman D.M., Ladisch M.R. Microscopic examination of changes of plant cell structure in corn stover due to hot water pretreatment and enzymatic hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*. 2007;97(2):265-278. DOI: 10.1002/bit.21298.

22. Zemnukhova L.A., Panasenkov A.E., Polyakova N.V., Skiba E.A., Budaeva V.V. Composition of inorganic components of oat husks and products of their chemical and enzymatic transformation. *Zhurnal prikladnoi khimii*. 2018;91(2):217-221. (In Russian). EDN: YRVLZF.

23. Kaur P., Singh S., Sharma N., Agrawal R. Filling in the gaps in second-generation biorefineries: evaluating rice straw and its bioethanol residue for the production of biogenic silica nanoparticles. *Nanotechnology for Environmental Engineering*. 2024;9:67-76. DOI: 10.1007/s41204-023-00351-8.

24. Zemnukhova L.A., Egorov A.G., Fedorishcheva G.A., Barinov N.N., Sokol'Nitskaya T.A., Botsul A.I. Properties of amorphous silica produced from rice and oat processing waste. *Inorganic Materials*. 2006;42:24-29. DOI: 10.1134/S0020168506010067.

25. Prempeh C.O., Formann S., Schliermann T., Dizaji H.B., Nelles M. Extraction and characterization of biogenic silica obtained from selected agro-waste in Africa. *Applied Sciences*. 2021;11(21):10363. DOI: 10.3390/app112110363.

26. Vistovskaya V.P., Kozhemyakin D.S., Kamenskaya E.P. Optimization of sunflower husk enzymolysis parameters through use of mathematical modeling methods. *Polzunovskiy vestnik*. 2025;1:103-109. (In Russian). DOI: 10.25712/ASTU.2072-8921.2025.01.012. EDN: USIKBN.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

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>

Будаева Вера Владимировна,
к.х.н., доцент, заведующий лабораторией,
ведущий научный сотрудник,
Институт проблем химико-энергетических
технологий СО РАН,
659322, г. Бийск, ул. Социалистическая, 1,
Российская Федерация,
budaeva@ipcet.ru
<https://orcid.org/0000-0002-1628-0815>

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

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Ekaterina I. Kashcheyeva,
Cand. Sci. (Engineering), Senior Researcher,
Institute for Problems of Chemical
and Energetic Technologies, Siberian Branch
of the Russian Academy of Sciences,
1, Sotsialisticheskaya St., Biysk, 659322,
Russian Federation,
✉ massl@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-1593-7982>

Vera V. Budaeva,
Cand. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
Head of the Laboratory, Leading Researcher,
Institute for Problems of Chemical
and Energetic Technologies, Siberian Branch
of the Russian Academy of Sciences,
1, Sotsialisticheskaya St., Biysk, 659322,
Russian Federation,
budaeva@ipcet.ru
<https://orcid.org/0000-0002-1628-0815>

Vladimir N. Zolotukhin,
Cand. Sci. (Engineering), Senior Researcher,
Institute for Problems of Chemical
and Energetic Technologies, Siberian Branch
of the Russian Academy of Sciences,
1, Sotsialisticheskaya St., Biysk, 659322,
Russian Federation,
zolotukhin_vn@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-9630-6332>

Вклад авторов

Е.И. Кашеева – разработка концепции, проведение исследования, валидация результатов, визуализация, написание черновика рукописи.
В.В. Будаева – курирование данных, получение финансирования, административное руководство исследовательским проектом, научное руководство, редактирование рукописи.
В.Н. Золотухин – разработка методологии, проведение исследования.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Информация о статье

Поступила в редакцию 03.04.2025.
Одобрена после рецензирования 09.09.2025.
Принята к публикации 15.09.2025.

Contribution of the authors

Ekaterina I. Kashcheyeva – conceptualization, investigation, validation, visualization, writing – original draft.
Vera V. Budaeva – data curation, funding acquisition, project administration, supervision, editing.
Vladimir N. Zolotukhin – methodology, investigation.

Conflict of interest

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 03.04.2025.
Approved after reviewing 09.09.2025.
Accepted for publication 15.09.2025.