

<https://doi.org/10.21603/2074-9414-2022-2-2361>
<https://elibrary.ru/PUHOFM>

Оригинальная статья
<https://fptt.ru>

Изучение процесса ферментативного гидролиза предобработанной биомассы мискантуса



О. Б. Калашникова^{1,*}, Е. А. Буденкова¹, Е. В. Ульрих²,
Е. Г. Чупахин¹, О. В. Кригер¹, Я. А. Масютин¹,
М. А. Смага¹, Ю. С. Басова¹

¹ Балтийский федеральный университет имени Иммануила Кант , Калининград, Россия

² Калининградский государственный технический университет , Калининград, Россия

Поступила в редакцию: 24.01.2022

Принята после рецензирования: 17.02.2022

Принята в печать: 11.04.2022

*О. Б. Калашникова: stas-asp@mail.ru,

<https://orcid.org/0000-0002-6105-8631>

Е. А. Буденкова: <https://orcid.org/0000-0003-4854-5459>

Е. В. Ульрих: <https://orcid.org/0000-0003-4107-7277>

Е. Г. Чупахин: <https://orcid.org/0000-0001-5284-4748>

О. В. Кригер: <https://orcid.org/0000-0002-1489-0716>

Я. А. Масютин: <https://orcid.org/0000-0003-4347-3425>

М. А. Смага: <https://orcid.org/0000-0001-5304-5761>

Ю. С. Басова: <https://orcid.org/0000-0001-5361-5971>

© О. Б. Калашникова, Е. А. Буденкова, Е. В. Ульрих, Е. Г. Чупахин,
О. В. Кригер, Я. А. Масютин, М. А. Смага, Ю. С. Басова, 2022



Аннотация.

В связи с тем что лесные ресурсы являются трудновозобновляемыми, ведется поиск альтернативных энергетических источников. Мискантус является одним из таких источников энергии. Целью данной работы являлось изучение процесса ферментативного гидролиза предобработанной биомассы мискантуса.

Объектом исследования являлась биомасса мискантуса китайского «Стриктус» (*Miscanthus sinensis* Strictus). Использовались методы предварительной обработки сырья, ферментативный гидролиз мискантуса, определение остатков моносахаров с помощью МАЛДИ-ГОФ и негидролизованного лигнина методом ЯМР ¹H спектроскопии.

Установлено, что для предварительной механической обработки биомассы мискантуса рационально применять молотковую дробилку с размером частиц мискантуса 0,2–0,3 мм. При данном виде обработки наблюдается максимальный выход углеводсодержащей биомассы (62,33 ± 1,87 %). Ферментативный гидролиз мискантуса целесообразно проводить с помощью мультиферментной композиции следующего состава: «Целлюлаза Ультра», полученная на основе селекционного штамма *Trichoderma reesei*, ксиланаза из *Thermomyces lanuginosus* и β-глюканаза из *Myceliophthorafergusii*. Температура ферментации 50 ± 1 °С, продолжительность 72 ± 1 ч. При указанных параметрах конверсия холоцеллюлозы биомассы мискантуса составляет 96,0 ± 4,8 %, выход редуцирующих веществ 97,00 ± 4,85 %.

В результате проведенных исследований научно обоснованы параметры ферментативного гидролиза предобработанной биомассы мискантуса китайского «Стриктус» для получения углеводсодержащих субстратов и последующего их использования для биосинтеза бактериальной целлюлозы. Анализ углеводного состава гидролизатов показал наличие остаточного лигнина, полисахаридов (глюкана и ксилана) и моносахаридов (арабинозы, ксилозы, галактозы, глюкозы и урановых кислот). Рекомендуется использовать гидролизированный мискантус в качестве возобновляемого и экологически чистого биотоплива.

Ключевые слова. Мискантус, биотопливо, ферментативный гидролиз, предобработка, редуцирующие сахара, негидролизированный лигнин, целлюлоза

Финансирование. Научно-исследовательская работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ) (соглашение № 19-416-390001), а также при поддержке Правительства Калининградской области (соглашение № 14-с/2021).

Для цитирования: Изучение процесса ферментативного гидролиза предобработанной биомассы мискантуса / О. Б. Калашникова [и др.] // Техника и технология пищевых производств. 2022. Т. 52. № 2. С. 254–270. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2022-2-2361>

Enzymatic Hydrolysis of Pretreated Miscanthus Biomass

Olga B. Kalashnikova^{1,*}, Ekaterina A. Budenkova¹, Elena V. Ulrikh²,
Evgeny G. Chupakhin¹, Olga V. Kriger¹, Yakov A. Masiutin¹,
Maria A. Smaga¹, Yulia S. Basova¹

¹ Immanuel Kant Baltic Federal University , Kaliningrad, Russia

² Kaliningrad State Technical University , Kaliningrad, Russia

Received: 24.01.2022

Revised: 17.02.2022

Accepted: 11.04.2022

*Olga B. Kalashnikova: stas-asp@mail.ru,

<https://orcid.org/0000-0002-6105-8631>

Ekaterina A. Budenkova: <https://orcid.org/0000-0003-4854-5459>

Elena V. Ulrikh: <https://orcid.org/0000-0003-4107-7277>

Evgeny G. Chupakhin: <https://orcid.org/0000-0001-5284-4748>

Olga V. Kriger: <https://orcid.org/0000-0002-1489-0716>

Yakov A. Masiutin: <https://orcid.org/0000-0003-4347-3425>

Maria A. Smaga: <https://orcid.org/0000-0001-5304-5761>

Yulia S. Basova: <https://orcid.org/0000-0001-5361-5971>

© O.B. Kalashnikova, E.A. Budenkova, E.V. Ulrikh, E.G. Chupakhin,
O.V. Kriger, Ya.A. Masiutin, M.A. Smaga, Yu.S. Basova, 2022



Abstract.

Forests being mostly non-renewable, miscanthus seems to be a promising alternative energy resource. This study investigates the enzymatic hydrolysis of pretreated miscanthus biomass.

The research featured *Miscanthus sinensis* Strictus biomass. The methods included raw material pretreatment, enzymatic hydrolysis, matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF) of monosaccharide residues, and nuclear magnetic resonance (¹H NMR) spectrometry of non-hydrolyzed lignin.

A hammer mill with a particle size of 0.2–0.3 mm proved to be effective for preliminary mechanical processing of miscanthus. This type of treatment provided the maximal yield of carbohydrate-containing biomass (62.33 ± 1.87%). The optimal multi-enzyme composition included Cellulase Ultra obtained from *Trichoderma reesei*, xylanase obtained from *Thermomyces lanuginosus*, and β-gluconase obtained from *Myceliophthorafergusii*. The fermentation temperature was 50 ± 1°C (72 ± 1 h). At these parameters, the conversion of holocellulose of miscanthus biomass was 96.0 ± 4.8%, and the yield of reducing substances was 97.00 ± 4.85%.

The article introduces the optimal enzymatic hydrolysis parameters for pretreating *Miscanthus sinensis* Strictus biomass as a source of carbohydrate-containing substrates and describes their subsequent use for bacterial cellulose biosynthesis. The carbohydrate composition of hydrolysates included residual lignin, such polysaccharides as glucan and xylan, and various monosaccharides, namely arabinose, xylose, galactose, glucose, and uronic acids. Hydrolyzed miscanthus proved to be an effective renewable and environmentally friendly biodiesel.

Keywords. Miscanthus, biofuel, enzymatic hydrolysis pretreatment, reducing sugars, non-hydrolysed lignin, cellulose

Funding. The research was supported by The Russian Foundation for Basic Research (RFBR)  (Agreement No. 19-416-390001) and the government of the Kaliningrad Region (Agreement No. 14-c/2021).

For citation: Kalashnikova OB, Budenkova EA, Ulrikh EV, Chupakhin EG, Kriger OV, Masiutin YaA, *et al.* Enzymatic Hydrolysis of Pretreated Miscanthus Biomass. Food Processing: Techniques and Technology. 2022;52(2):254–270. (In Russ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2022-2-2361>

Введение

В качестве основных источников энергии используют природный газ, каменный уголь, торф и нефть [1, 2]. Все эти ресурсы невозобновимые и их запасы истощаются. В этой связи остро стоит вопрос поиска альтернативных возобновляемых

энергетических источников, среди которых можно выделить растительное сырье. Такое возобновляемое растительное сырье, как деревья, является медленно возобновляемым энергетическим ресурсом. 23 % территории Российской Федерации занято

лесополосой: на более 71,4 млн га приходится 81,2 м³ запаса этого ресурса [3].

В связи с тем что лесные ресурсы являются трудновозобновляемыми и в России формируется бережливое отношение к лесу, перспективным и актуальным является вопрос поиска альтернативных возобновляемых энергетических источников, помимо древесины [4]. Кроме того, необходимо задумываться об экологических вопросах, связанных с производством и применением энергетических ресурсов. Большое внимание уделяется возможностям применения растительного сырья для производства биологического топлива. Создание энергосберегающей малоотходной технологии переработки растительных компонентов, содержащих большое количество целлюлозы, в энергопродукты является фундаментальным и актуальным направлением развития биотехнологии во всех странах [5]. В Финляндии 23 % энергоресурсов обеспечивается за счет переработки растительного сырья, а в Швеции и Австрии на долю биологического топлива приходится 18 и 12 % соответственно [6]. Подробный анализ сложившейся ситуации в Российской Федерации свидетельствует о том, что в качестве основного источника биологического топлива могут выступать отходы, образующиеся на деревоперерабатывающих предприятиях. Маркетологи выяснили, что к 2025 г. уровень отходов достигнет 110 млн т, из которых можно произвести более 8 млн т биотоплива [7]. Количество этого биологического топлива достаточно, чтобы повысить качественные показатели используемого бензина [8, 9].

Получаемая биологическая масса в процессе переработки древесного и растительного сырья может быть применена в качестве источника тепла или преобразована с помощью биотехнологических и/или химических методов в дизельное топливо, газ или биологический этиловый спирт [10]. Источником сырья для таких продуктов могут выступать подсолнечная лузга, солома, отходы производства кукурузы и т. д. Доля этих отходов в России увеличивается с каждым годом [11]. Количество растительных отходов в России за последние годы возросло до 50 млн т. Согласно данным, представленным в базе данных IENICA (www.ienica.net/cropsdatabase.htm), в мире существует более 90 видов травянистых растений, которые перспективны в качестве альтернативных энергетических источников в топливно-энергетической и химической промышленности. Повышенное внимание к данному типу растений можно объяснить тем, что такие растения размножаются преимущественно семенами, легко возделываются, хорошо культивируются в любых климатических и сезонных условиях и не требуют обогащения дополнительными питательными компонентами грунта [9, 10]. Основным

преимуществом таких видов растения является высокая скорость накопления целлюлозы.

Среди таких растений можно выделить травянистое растение рода мискантус (*Miscanthus*) [11]. Он характеризуется повышенной продуктивностью целлюлолитических веществ и способностью активно расти и развиваться даже в сложных климатических условиях (низкие температурные режимы, обедненная питательными веществами почва) [12]. Еще одним преимуществом растения рода мискантус является то, что он устойчив практически ко всем вредителям и болезням. Это снижает экономические затраты на его обработку химическими препаратами [3]. Мискантус способен расти на одном месте с высокой производительностью более 15 лет [4]. Растение семейства (рода) мискантус способно улучшать экологическое состояние окружающей среды и почвы: защищать ее от процессов эрозии, снижать содержание углекислого газа и повышать содержание органических веществ [1, 11]. Установлено, что на первых этапах возделывания культура хорошо культивируется на почвах, где ранее высаживались крахмалосодержащие культуры, такие как кукуруза. При хорошей влажности почвы мискантус дает высокий урожай растительной биомассы [4, 6]. Подробные исследования показали, что Россия имеет благоприятные климатические условия для возделывания травянистого растения рода мискантус, а также богата посевными площадями в северо-западной и западной частях страны [7].

Потенциальная продуктивность мискантуса при благоприятных факторах внешней среды может достигать 40 т сухой массы с 1 га. Реальная зависит от величины прихода фотосинтетической активной радиации и эффективности ее использования, почвенно-гидротермических условий выращивания, продолжительности вегетационного периода и вида растения. По усредненным данным [13], урожайность трехлетних посадок мискантуса в условиях Англии составила, т/га: у *Miscanthus giganteus* – 13,8–18,7, *Miscanthus sacchariflorus* – 11,0–12,0, *Miscanthus sinensis* – 4,6–10,9; в Германии – 22,8–29,1, 12,0–13,0 и 9,1–12,8, в Португалии – 34,7–37,8, 35,0–36,0 и 16,1–22,4 соответственно. Влияние климатических условий региона на урожайность мискантуса показано в работах ряда отечественных и зарубежных авторов [13].

В таких штатах США, как Нью-Джерси, Иллинойс и Небраска, урожайность *M. giganteus* составила 9,5, 15,6 и 27,7 т/га, соответственно в Испании – 17,6 т/га, во Франции – 22 т/га; в Европейской части России 7,8, 5,7 и 4,2 т/га для *M. sinensis*, *M. giganteus* и *M. sacchariflorus* соответственно; в Западной Сибири урожай *M. giganteus* составил 16,6 т/га, *M. sacchariflorus* – 12,0 т/га.

Растительная биомасса травянистого растения рода *Miscanthus* может применяться в промышленности

в качестве источника получения композитных материалов, строительных элементов, топливных брикетов или топлива, а также для производства бумаги, хлорофилла, питательного компонента для микроорганизмов, растений и т. д. [13, 14].

Основными преимуществами применения растительной биомассы мискантуса в качестве источника биологического топлива являются [15]:

- низкая себестоимость полученного тепла: затраты на производство 1 Гкал тепла из мискантуса составят \$ 4–15, в то время как затраты на производство этого же количества тепла, выработанного из мазута, составят более \$ 28, из газа – более \$ 34, из каменного угля – более \$ 20;
- возобновляемый ресурс;
- экологичность продукта и сырья.

Также мискантус является перспективным сырьем для получения технической целлюлозы, потребность в которой последние двадцать лет увеличилась. Уже ведутся научные изыскания по возможности применения мискантуса для получения технической целлюлозы [16–19].

Растительная биомасса является источником глюкозы, которую можно получить гидролитическим способом с применением ферментных препаратов [20–23]. Простые сахара являются головным сырьем для получения различного биологического топлива, органических кислот, белков, аминокислот и гормонов, которые получают в результате биотехнологических процессов, в том числе микробиологического синтеза [24–27]. Главным недостатком растительного сырья является то, что растительная клеточная стенка очень прочная и не может быть использована микроорганизмами как субстрат, а современные методы биотехнологии с этой задачей еще не справляются [28–30].

С целью изучения возможностей применения травянистого растения рода мискантус в промышленных масштабах в 2012 г. ученые начали исследования по теме «Оптимизация производства биомассы мискантуса» в рамках реализации проекта Европейского Союза FP7-KBBE-2011-5. Проект охватывает шесть стран Европейского союза, которые по единой схеме на полях засеяли различные сорта мискантуса [26]. В исследованиях участвовала Россия (полевые испытания ведутся на территории станции РГАУ – МСХА имени К. А. Тимирязева). В ходе эксперимента на полях высевали различные виды мискантуса: мискантус сахароцветковый (*M. sacchariflorus*), мискантус китайский (*M. sinensis* Anderss), мискантус гибридный (*Miscanthus × hybrid*) и мискантус гигантский (*Miscanthus × giganteus* Greef&Deu). В ходе эксперимента выявлено, что урожайность мискантуса зависит от места его возделывания [2]. Наилучшая урожайность мискантуса отмечена в Германии, Турции и Украине. Незначительные результаты по урожайности пока-

зали такие страны, как Великобритания и Россия. В России урожайность мискантуса в 2013 г. составила 3 т сухого вещества с 1 га, в то время как в Турции это значение достигло более 12 т сухого вещества с 1 га [6]. Исследования продолжаются [1–3, 5–7, 11–13].

Целью данной работы являлось изучение процесса ферментативного гидролиза предобработанной биомассы мискантуса.

В задачи исследования входили:

- подбор параметров предварительной механической и химической обработки биомассы мискантуса с целью последующего получения углеводсодержащих субстратов для биотехнологии;
- разработка рациональных режимов проведения ферментативного гидролиза предобработанной биомассы мискантуса для получения углеводсодержащих субстратов для биотехнологии (состав мультиферментной композиции, температура, продолжительность гидролиза);
- анализ углеводного состава гидролизатов, полученных в результате ферментативного гидролиза биомассы мискантуса.

Объекты и методы исследования

С целью разработки технологии получения углеводсодержащих субстратов для биотехнологии из травянистого растения мискантус китайский «Стриктус» (*Miscanthus sinensis* Strictus) проводили подбор основных параметров предварительной механической обработки биомассы мискантуса. Выбор механической обработки зависел от способа обработки, размера частиц, выхода и химического состава углеводсодержащей биомассы [31–33]. Подбор условий механической обработки мискантуса осуществляли на основании общего выхода углеводсодержащей биомассы из мискантуса. Механическую обработку мискантуса проводили тремя способами: измельчением до размера частиц 1 см и 1 мм ножевой мельницей SecoMS (NETZSCH-Feinmahltechnik GmbH, Германия) и измельчением до размера частиц 0,2–0,3 мм молотковой дробилкой (ООО «Уральский завод котельного оборудования», Асбест, Россия). Размер частиц после помола изучали штангельциркулем и линейкой. Выводили среднее значение. Каждое измерение проводили в трех повторностях. Выход углеводсодержащей биомассы определяли хлорным методом [34].

Температура предварительной обработки была установлена 121 ± 2 °С. Предварительная обработка щелочью проводилась с концентрацией гидроксида натрия 1,0 % в течение 30 ± 2 мин. Концентрация кислот составляла 3,0 %, обработку проводили в течение 60 ± 2 мин. Для этого 50 г измельченной с помощью молотковой дробилки биомассы мискантуса предварительно обрабатывали в стеклянных колбах, каждая из которых содержала 10 г измельченного

мискантуса и 100 мл химического реагента (раствор гидроксида натрия или растворы органических кислот). Далее колбы герметично закрывали и автоклавировали в автоклаве (модель 3021, Amsco, Mentor, США) при температуре 121 ± 2 °С в течение времени предварительной обработки (30 ± 2 мин). На следующей стадии предварительно обработанный мискантус собирали с помощью метода вакуумной фильтрации и промывали 500 мл деионизированной водой для удаления остаточных реагентов. Биомассу, полученную из колб, смешивали в пластиковых банках (500 мл) и проводили анализ по разложению углеводов.

Для оценки разложения углеводов изучали количественное содержание (глюкана и ксилана) [35]. Для этого влажный и предварительно обработанный мискантус в количестве 4 г сушили в вакуумном сушильном шкафу при температуре 40 ± 2 °С. Оставшийся предварительно обработанный мискантус хранили не более трех дней при температуре 4 ± 2 °С для последующего ферментативного гидролиза.

Для исследования использованы образцы биомассы мискантуса китайского «Стриктус», измельченной на молотковой дробилке до размеров 0,2–0,3 мм с последующей делигнификацией трихлоуксусной кислотой [36].

Для ферментативного гидролиза были использованы коммерчески доступные препараты целлюлаз грибного происхождения: целлюлаза из *Aspergillus niger*, целлюлаза из *Trichoderma reesei* («Целлюлаза Ультра»), ксиланаза из *Thermomyces lanuginosus* и β -глюканаза из *Myceliophthora fergusii*.

Проводили оценку целлюлазной активности коммерческого ферментного препарата «Целлюлаза Ультра» и мультферментных композиций в диапазоне концентрации 0,1–10,0 мг/мл цитратного буфера, в отношении субстрата с концентрацией 50 г/л при температуре 40 ± 1 °С и рН 4,7. Степень гидролиза определяли в пересчете на холоцеллюлозу из расчета содержания холоцеллюлозы в растительной биомассе 70 %.

Ферментативный гидролиз осуществляли стационарно в течение 72 ч для всех образцов при температуре 40 ± 1 °С и рН 4,7. Концентрация субстрата во всех пробах составляла 50 г/л, концентрация ферментного препарата в каждом образце – 0,1 мг/мл цитратного буфера.

Определение содержания редуцирующего вещества и D-глюкозы в пробе осуществлялось с использованием реагента 3,5-динитросалициловой кислоты на спектрофотометре Shimadzu UV-1800 (Shimadzu, Япония) при длине волны 530 нм в кюветках с толщиной поглощающего свет слоя 10 мм.

Далее проводили анализ углеводного состава гидролизатов, полученных в результате ферментативного гидролиза биомассы мискантуса китайского «Стриктус».

Полученные гидролизаты исследовали методом МАЛДИ-ТОФ с целью определения остатков моносахаридов, полисахаридов и лигнина. Для этого проводили оценку профиля молекулярных масс экстрагированных лигнинов с использованием техники МАЛДИ-ТОФ спектрометрии по модифицированной методике [37].

Масс-спектры получены с применением времяпролетного масс-спектрометра Bruker Autoflex с системой ионизации методом лазерной десорбции ионизации в линейном режиме сканирования положительно заряженных ионов. Параметры настройки во всех случаях одинаковы:

- напряжение на ионных источниках 19,5 и 18,45 кВ соответственно;
- напряжение ионной линзы 8 кВ;
- лазер: Nd: YAG;
- частота излучения 1 ГГц;
- количество импульсов на одно измерение – 500.

Во всех случаях в качестве матрицы применяли насыщенный раствор α -циано-4-гидрокси-коричной кислоты в смеси 1:1 ацетонитрил:вода с добавкой 0,1 %-ной трифторуксусной кислоты.

Негидролизированный лигнин определяли следующим образом: отделяли негидролизированный остаток после ферментативного гидролиза фильтрацией, подкисляли фильтрат лигнина соляной кислотой до образования осадка лигнина, разделяли лигнин методом препаративной ВЭЖХ с использованием хроматографа Shimadzu (Shimadzu, Япония), скорость потока 10 мл/мин, градиент фазы А–Б 1–90 % за 15 мин (фаза А – 0,1 % трифторуксусной кислоты, Б – ацетонитрил). Каждую индивидуальную фракцию упаривали до суха, взвешивали, определяли выход, структуру соединений идентифицировали методом ЯМР ^1H спектрометрии.

Наибольшее распространение в исследовании органических веществ имеет спектроскопия протонного магнитного резонанса (ЯМР ^1H). ЯМР ^1H спектры получали с помощью ЯМР-спектрометра Bruker Avance (Bruker, Германия) с рабочей частотой 400 МГц. Данная частота магнитного поля отвечает за разность энергетических уровней водородного ЯМР-спектра. При данной частоте именно ядро водорода будет поглощать энергию и перейдет с нижнего энергетического уровня на верхний, на спектрограмме фиксируются данные пики (рис. 6). Частота 400 МГц не позволяет зафиксировать углеродный ЯМР-спектр.

Результаты и их обсуждение

Результаты выхода углеводсодержащей биомассы, в зависимости от способа механической обработки, представлены в таблице 1.

С целью более полной оценки влияния механической обработки травянистого растения

Таблица 1. Условия механической обработки мискантуса китайского «Стриктус»

Table 1. Conditions for mechanical processing of *Miscanthus sinensis* Strictus

Способ механической обработки/размер частиц	Размер частиц, мм	Выход углеводсодержащей биомассы %
Ножевая мельница/1 см	9,8–13,0	36,00 ± 1,08
Молотковая дробилка/0,2–0,3 мм	0,2–0,3	62,33 ± 1,87
Ножевая мельница/1 мм	0,8–1,1	60,33 ± 1,81

мискантус китайский «Стриктус» (*Miscanthus sinensis* Strictus) изучали химический состав полученной разными способами механической обработки углеводсодержащей биомассы. Для этого методом ВЭЖХ оценивали качественный и количественный состав углеводов [38]. Результаты представлены в таблице 2.

Далее проводили подбор параметров химической обработки биомассы мискантуса с целью последующего получения углеводсодержащих субстратов для биотехнологии [39]. Для этого использовали гидроксид натрия (NaOH), разбавленные бензойная, перфторуксусная, надуксусная и пербензойная кислоты, делигнификацию и ультразвук.

Результаты изучения представлены в таблице 3.

Таблица 2. Химический состав полученной разными способами механической обработки углеводсодержащей биомассы травянистого растения мискантус китайский «Стриктус»

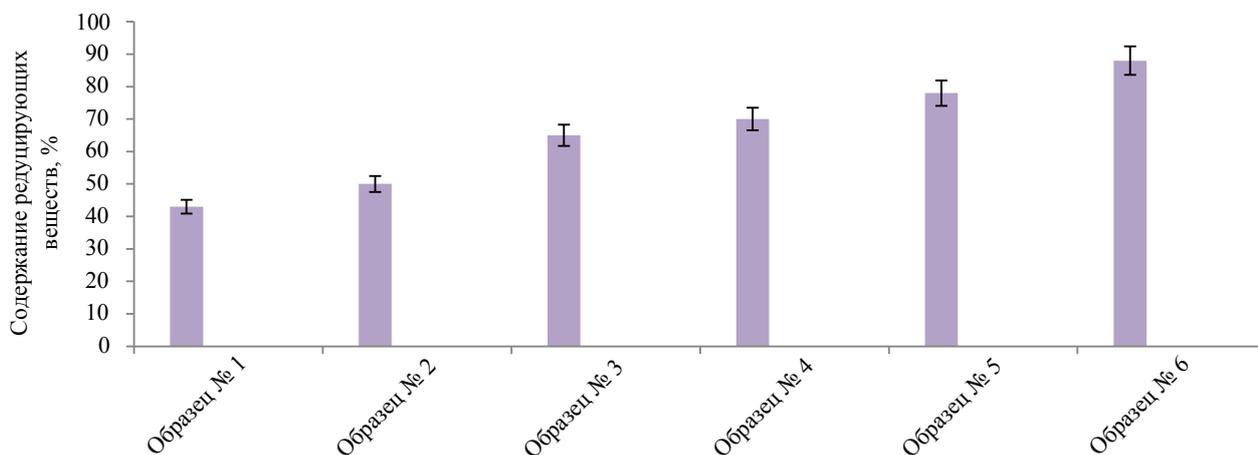
Table 2. Chemical composition of the carbohydrate-containing biomass of *Miscanthus sinensis* Strictus obtained by various methods of mechanical treatment

Наименование вещества	Массовая доля, %		
	Ножевая мельница/1 см	Молотковая дробилка/0,2–0,3 мм	Ножевая мельница/1 мм
Целлюлоза	27,80 ± 0,83	63,50 ± 1,90	48,20 ± 1,44
Лигнин	22,30 ± 0,67	19,60 ± 0,58	11,40 ± 0,34
Углеводы	26,90 ± 0,80	7,30 ± 0,21	29,30 ± 0,88
Глюканы	10,80 ± 0,32	6,30 ± 0,19	4,60 ± 0,14
Ксиланы	12,20 ± 0,37	3,30 ± 0,09	6,50 ± 0,19

Результаты ферментативного гидролиза целлюлозосодержащего сырья мискантуса китайского «Стриктус» различными видами ферментных препаратов и мультиферментными композициями представлены на рисунках 1 и 2.

Влияние продолжительности ферментативного гидролиза мискантуса на выход редуцирующих веществ при различных температурах представлено на рисунке 3.

Результаты исследования лигнина, полученного в процессе ферментативного гидролиза из биомассы

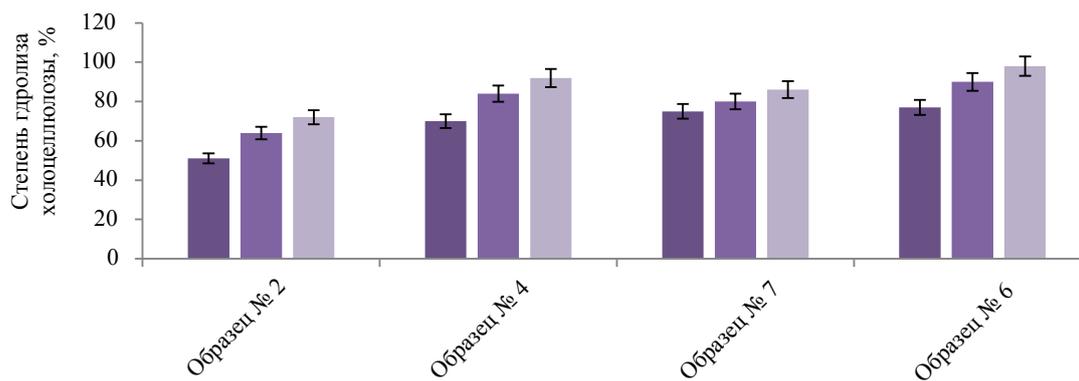


Ферменты и ферментные композиции

Образец № 1 – Целлюлаза из *Aspergillus niger*; Образец № 2 – Целлюлаза «Целлюлаза Ультра»; Образец № 3 – Целлюлаза из *Aspergillus niger* с ксиланазой из *Thermomyces lanuginosus*; Образец № 4 – Целлюлаза «Целлюлаза Ультра» с ксиланазой из *Thermomyces lanuginosus*; Образец № 5 – Целлюлаза из *Aspergillus niger* с ксиланазой из *Thermomyces lanuginosus* и β -глюканазой из *Myceliophthorafergusii*; Образец № 6 – Целлюлаза «Целлюлаза Ультра» с ксиланазой из *Thermomyces lanuginosus* и β -глюканазой из *Myceliophthorafergusii*

Рисунок 1. Ферментативный гидролиз биомассы мискантуса

Figure 1. Enzymatic hydrolysis of miscanthus biomass



Ферменты и ферментные композиции

Образец № 2 – Целлюлаза «Целюлаза Ультра»; Образец № 4 – Целлюлаза «Целюлаза Ультра» с ксиланазой из *Thermomyces lanuginosus*; Образец № 7 – Целлюлаза «Целюлаза Ультра» с β -глюканазой из *Myceliophthorafergusii*; Образец № 6 – Целлюлаза «Целюлаза Ультра» с ксиланазой из *Thermomyces lanuginosus* и β -глюканазой из *Myceliophthorafergusii*

■ 0,1 мг/мл ■ 1 мг/мл ■ 10 мг/мл

Рисунок 2. Ферментативный гидролиз биомассы мискантуса при различных концентрациях ферментных препаратов

Figure 2. Enzymatic hydrolysis of miscanthus biomass at various concentrations of enzyme preparations

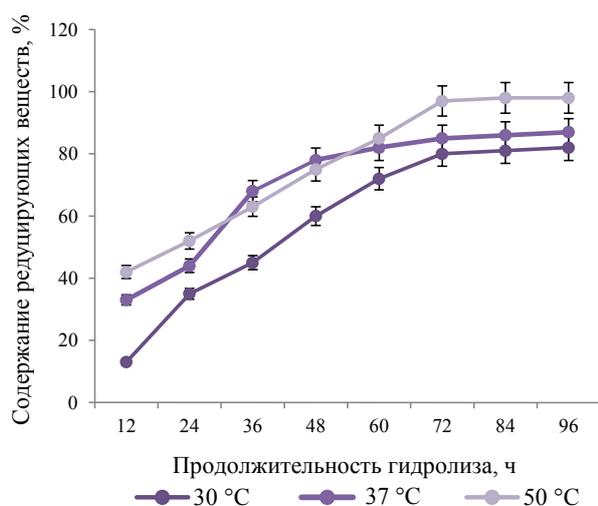


Рисунок 3. Влияние продолжительности гидролиза на выход редуцирующих веществ при различных температурах

Figure 3. Effect of hydrolysis time on the yield of reducing substances at different temperatures

мискантуса китайского «Стриктус», представлены на рисунке 4.

В результате анализа полученных данных МАЛДИ-ТОФ масс-спектрометрии сделан вывод о структуре фрагментов лигнина, полученного в результате ферментативного гидролиза биомассы мискантуса (рис. 5).

Состав лигнина и полисахаридов, полученных методом ферментативного гидролиза при различной продолжительности, представлен в таблице 4.

Состав моносахаридов, полученных в результате воздействия ферментативного гидролиза на целлюлозу мискантуса, определенный методом МАЛДИ-ТОФ спектрометрии, представлен в таблице 5.

Химический состав мискантуса после ферментативного гидролиза представлен в таблице 6. ЯМР ^1H спектры остаточного лигнина представлены на рисунке 6.

Анализ ЯМР ^1H спектров позволил предположить варианты структуры негидролизованного остаточного лигнина после ферментативного гидролиза мискантуса, которые представлены на рисунке 7.

Анализ результатов, представленных в таблице 1, свидетельствует о том, что максимальный выход углеводсодержащего сырья наблюдается при применении молотковой дробилки (2,33 %), а наименьший – при применении ножевой мельницы (36,00 %) с применением частиц от 9,8 до 13,0 мм. В случае применения ножевой мельницы и более мелких частиц растительного сырья выход углеводсодержащей биомассы увеличивается практически в два раза, т. е. составил 60,33 %.

Из табличных данных следует, что при способе механической обработки ножевой мельницей с размером частиц мискантуса 1 см выход углеводсодержащей биомассы составил 36 %. При этом наблюдался наименьший выход целлюлозы (21 %) и наибольший выход лигнина ($22,30 \pm 0,67$ %).

Таблица 3. Степень разложения углеводов углеводсодержащей биомассы травянистого растения мискантус китайский «Стриктус»

Table 3. Decomposition of carbohydrates in the carbohydrate-containing biomass of *Miscanthus sinensis* Strictus

Способ химической обработки	Степень разложения углеводов %	
	Глюкан	Ксилан
NaOH	31,92 ± 0,95	29,40 ± 0,88
Бензойная кислота	43,26 ± 1,29	56,86 ± 1,70
Перфторуксусная кислота	87,41 ± 2,62	80,55 ± 2,41
Надуксусная кислота	64,90 ± 1,94	47,23 ± 1,41
Пербензойная кислота	51,61 ± 1,55	32,89 ± 0,98
Ультразвук	68,97 ± 2,07	75,31 ± 2,26
Делигнификация трифторуксусной кислотой	95,72 ± 2,87	75,94 ± 2,27

Анализ данных с использованием молотковой дробилки с размером частиц мискантуса 0,2–0,3 мм позволяет сделать вывод о том, что максимальное накопление углеводсодержащей биомассы составило 62,33 %. Установлено, что при применении молотковой дробилки наблюдался максимальный выход целлюлозы $63,50 \pm 1,90$ % и наименьший выход ксиланов ($3,30 \pm 0,09$ %) и углеводов

($7,30 \pm 0,21$ %). Определено, что массовая доля лигнина составила $19,60 \pm 0,58$ %. Это выше, чем в углеводсодержащей биомассе, полученной с помощью ножевой мельницы с размером частиц мискантуса 1 мм. Содержание гликанов при использовании молотковой дробилки в 1,37 раз выше, чем при применении ножевой мельницы с размерами частиц мискантуса 1 мм. Установлено, что при использовании ножевой мельницы и размера частиц мискантуса 1 мм наблюдается максимальный выход углеводов ($29,30 \pm 0,88$ %) и наименьший выход лигнина ($11,40 \pm 0,34$ %). Полученные данные согласуются с исследованиями [40–42].

В исследовании [43] описано, что энергозатраты на измельчение мискантуса с помощью молотковой мельницы могут достигать 50–65 кДж/кг собранной биомассы мискантуса. Это может увеличить затраты на обработку мискантуса перед ферментативным гидролизом. Однако, согласно исследованию [43], необходимость такой обработки не вызывает сомнений, т. к. выход целлюлозы из предобработанной биомассы мискантуса превышает значения, полученные без предварительной обработки.

Исходя из анализа табличных данных (табл. 1–3), можно сделать вывод о том, что оптимальным является способ механической обработки с помощью молотковой мельницы с размером частиц мискантуса

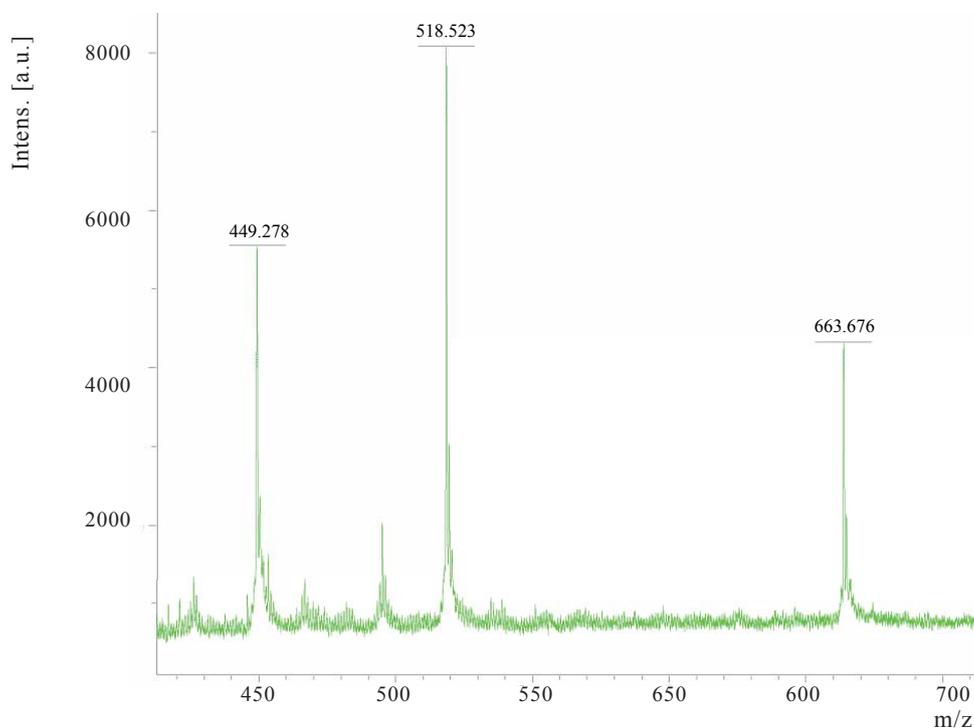


Рисунок 4. Результаты исследования гидролизатов, полученных методом ферментативного гидролиза биомассы мискантуса, методом МАЛДИ-ТОФ спектрометрии

Figure 4. Hydrolysates obtained by enzymatic hydrolysis of miscanthus biomass by MALDI-TOF spectrometry

Таблица 4. Состав лигнина и полисахаридов, полученных в результате ферментативного гидролиза при различной продолжительности

Table 4. Composition of lignin and polysaccharides obtained as a result of enzymatic hydrolysis at various times

Время ферментативного гидролиза, ч	Полисахариды, %		Остаточный лигнин, %		
	Глюкан	Ксилан	Не растворимый в кислоте	Растворимый в кислоте	Негидролизированный
24	18,40 ± 0,11	2,50 ± 0,81	7,80 ± 0,52	1,70 ± 0,06	9,50 ± 0,46
48	32,20 ± 2,14	4,40 ± 0,33	7,60 ± 1,40	1,50 ± 0,02	8,40 ± 1,72
72	38,80 ± 0,27	7,20 ± 0,01	1,00 ± 2,19	1,30 ± 0,06	2,10 ± 2,13
96	29,70 ± 5,32	н.о.*	6,80 ± 1,72	1,60 ± 0,01	8,10 ± 2,48
120	29,10 ± 0,21	н.о.	7,40 ± 2,48	1,50 ± 0,04	9,10 ± 1,42

н.о.* – не обнаружено.

н.о.* – not detected.

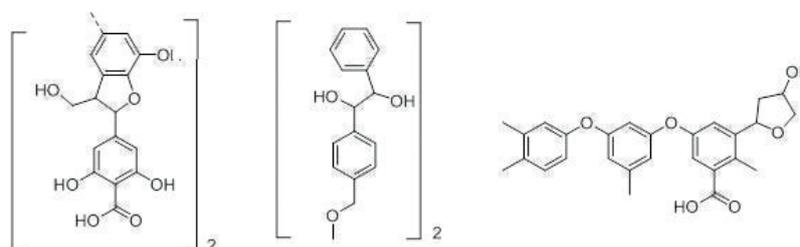


Рисунок 5. Структура фрагментов гидролизованного лигнина, полученного в результате ферментативного гидролиза биомассы мискантуса

Figure 5. Fragments of hydrolyzed lignin obtained as a result of enzymatic hydrolysis of miscanthus biomass

0,2–0,3 мм, выходом углеводсодержащей биомассы 62,33 ± 1,87 % и целлюлозы 63,50 ± 1,90 %.

Анализ данных таблицы 3 позволяет сделать вывод о том, что наибольшее разложение углеводов наблюдалось при применении метода делигнификации трифторуксусной кислотой за счет полного разрушения перекрестно-сложноэфирных связей между лигнином и гемицеллюлозой. В ходе гидролиза происходило формирование темной гуминоподобной окраски за счет образования гуминоподобных веществ – природных органических соединений. Количество разложившегося глюкана в этом случае составило 95,72 ± 2,87 %, ксилана – 75,94 ± 2,27 %. При обработке ультразвуком разлагается достаточно большое количество углеводов на глюкан (68,97 ± 2,07 %) и ксилан (75,31 ± 2,26 %) по сравнению с использованием водного раствора гидроксида натрия и растворов органических кислот. При применении водного раствора гидроксида натрия образуется 31,92 ± 0,95 % глюкана и 29,40 ± 0,88 % ксилана, а при использовании водного раствора бензойной кислоты – 43,26 ± 1,29 % глюкана и 56,86 ± 1,70 % ксилана. В случае применения перфторуксусной кислоты для разложения углеводов углеводсодержащей биомассы травянистого растения мискантус китайский «Стриктус»

образуется 87,41 ± 2,62 % глюкана и 80,55 ± 2,41 % ксилана. При использовании водного раствора надуксусной кислоты образуется 47,23 ± 1,41 % глюкана и 80,55 ± 2,41 % ксилана. Установлено, что степень разложения углеводов углеводсодержащей биомассы травянистого растения мискантус китайский «Стриктус» при применении пербензойной кислоты достигает 51,61 ± 1,55 % по глюкану и 32,89 ± 0,98 % по ксилану.

Наиболее рациональной является механическая обработка биомассы мискантуса с использованием молотковой дробилки с размером частиц мискантуса 0,2–0,3 мм и выходом углеводсодержащей биомассы 62,33 ± 1,87 %. В качестве химической обработки биомассы мискантуса выбрана делигнификация трифторуксусной кислотой со степенью разложения углеводов до глюкана 95,72 ± 2,87 % и ксилана 75,94 ± 2,27 % для проведения ферментативного гидролиза предобработанной биомассы мискантуса с целью получения углеводсодержащих субстратов для биотехнологии. Полученные данные подтверждаются несколькими исследованиями, в которых получены аналогичные результаты [44].

Основной проблемой, ограничивающей использование растительной биомассы в биотехнологии, является отсутствие технологий переработки, способных преобразовать клеточную

Таблица 5. Состав моносахаридов, полученных в результате воздействия ферментативного гидролиза на целлюлозу мискантуса

Table 5. Composition of monosaccharides obtained as a result of enzymatic hydrolysis of miscanthus cellulose

№ п/п	Название моносахаридов	Содержание моносахаридов, %				
		24 ч	48 ч	72 ч	96 ч	120 ч
1	Арабиноза	1,86 ± 0,09	2,05 ± 0,10	2,45 ± 0,12	2,25 ± 0,11	1,95 ± 0,10
2	Ксилоза	18,68 ± 0,93	20,42 ± 1,02	24,40 ± 1,22	23,40 ± 1,17	22,50 ± 1,13
3	Галактоза	0,32 ± 0,02	0,45 ± 0,02	0,50 ± 0,03	0,48 ± 0,02	0,37 ± 0,02
4	Глюкоза	28,40 ± 1,42	35,10 ± 1,76	40,50 ± 2,02	38,20 ± 1,91	35,50 ± 1,76
5	Уроновые кислоты	1,50 ± 0,08	1,90 ± 0,10	2,10 ± 0,10	1,80 ± 0,09	1,70 ± 0,09

Таблица 6. Химический состав мискантуса после ферментативного гидролиза

Table 6. Chemical composition of miscanthus after enzymatic hydrolysis

№ п/п	Показатель	Массовая доля, %
1	Жировосковая фракция	4,95 ± 0,05
2	Зольность	5,82 ± 0,05
3	Лигнина	22,50 ± 0,50
4	Пентозаны	20,80 ± 0,50
5	Целлюлоза по Кюршнеру	53,30 ± 0,50

стенку растений в субстрат для микроорганизмов [45–47]. На данном этапе исследования осуществляли подбор параметров ферментативного гидролиза предобработанной биомассы мискантуса целлюлолитическими ферментами препаратами для выявления наибольшей степени биоконверсии целлюлозосодержащего сырья и дальнейшего использования полученных гидролизатов в качестве субстратов для биосинтеза бактериальной целлюлозы [48–50].

Для расщепления целлюлозы необходимо синергическое действие трех ферментов: эндо-глюканазы (ЕС 3.2.1.4); экзоглюканазы, включая целлодекстриназы (ЕС 3.2.1.74) и целлобиогидролазы (ЕС 3.2.1.91, ЕС 3.2.1.176); β-глюкозидазы (ЕС 3.2.1.21). Цепь целлюлозы случайным образом разрезает эндоглюканазы, целлобиогидролазы атакуют конец целлюлозной цепи, а β-глюкозидазы гидролизуют целлобиозу и короткие (растворимые) сахара до глюкозы.

Для более полного гидролиза гемицеллюлозы требуется эндо-β-1,4-ксилазная активность. Эля этого планируется использовать ксиланазу. Ксиланаза представляет собой комплекс ферментов, задействованных в деградации гетерогенного полисахарида – ксилана. Основным является фермент эндо-1,4-ксилаза (КФ 3.2.1.8), который катализирует распад ксилана до ксилоолигосахаридов. Другие ферменты, такие как ксилозидаза, L-арабинофуразидаза, глюкуронидаза и эстераза (ксиланацетилэстераза и ферилоилэстераза), выполняют полный гидролиз ксилоолигосахаридов до мономеров [51–53].

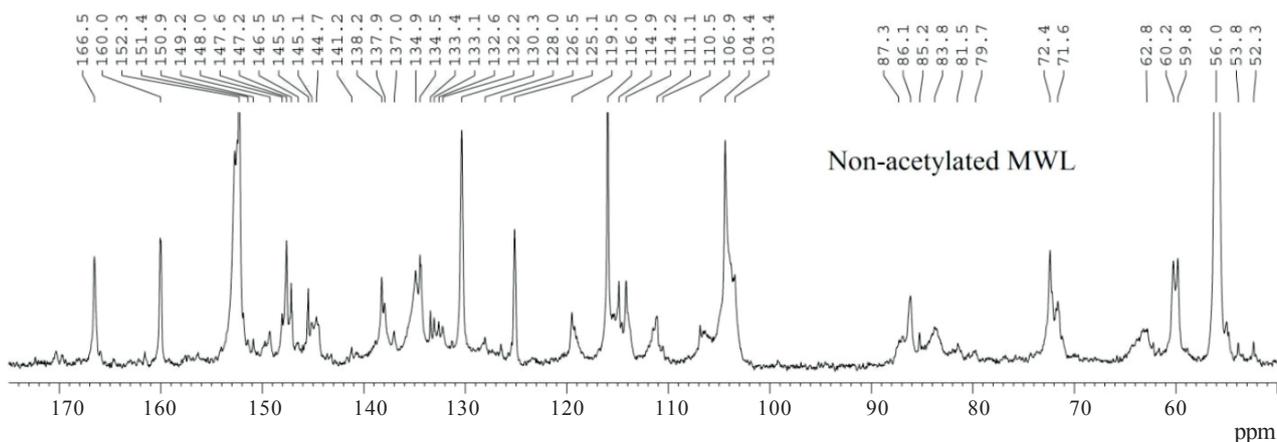


Рисунок 6. ЯМР ¹H спектры негидролизованного остаточного лигнина

Figure 6. ¹H NMR spectra of non-hydrolyzed residual lignin

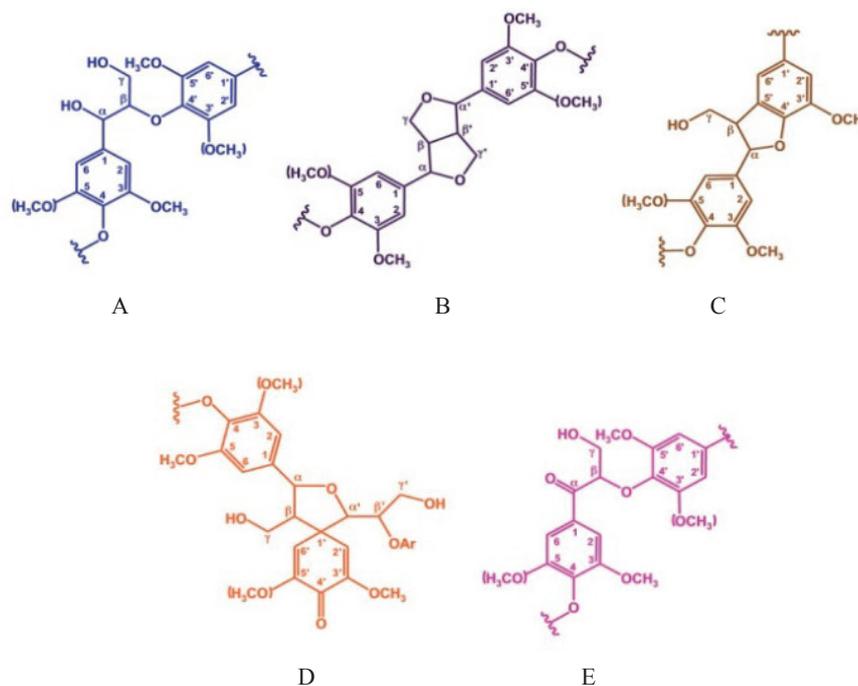


Рисунок 7. Предположительные варианты структуры негидролизованного остаточного лигнина

Figure 7. Presumable variants of the structure of non-hydrolyzed residual lignin

Из рисунка 1 видно, что добавление в реакционную смесь ксиланазы способствует более полному расщеплению холоцеллюлозы мискантуса. Содержание редуцирующих веществ увеличивается на $12,0 \pm 0,6$ % в комбинации с целлюлазой из *Aspergillus niger* (Образец № 1) и на $20,0 \pm 1,0$ % в комбинации с целлюлазой «Целлюлаза ультра» (Образец № 2). Наибольшее содержание редуцирующих веществ наблюдается при использовании мультиферментных композиций, в составе которых находится β -глюканаза (Образцы № 5 и 6), катализирующая 1,3 и 1,4 гликозидные связи из β -глюканов, а также способная к расщеплению гемицеллюлозы, ксиланов и целлюлозы.

Максимальный выход редуцирующих веществ составил $88,0 \pm 4,4$ % в результате гидролиза биомассы мискантуса мультиферментной композицией, состоящей из «Целлюлозы Ультра», ксиланазы из *Thermomyces lanuginosus* и β -глюканазы из *Myceliophthorafergusii* (Образец № 6). Целлюлаза из *A. niger* (Образец № 1) показывает недостаточную целлюлолитическую активность даже в комбинации с другими ферментами (Образцы № 3 и 5). Поэтому дальнейшие исследования будут проводиться с «Целлюлазой Ультра» в комплексе с ксиланазой и β -глюканазой (Образцы № 4 и 6).

Анализ результатов, представленных на рисунке 2, свидетельствует о том, что коммерческий ферментный препарат «Целлюлаза Ультра», который представляет собой комплекс ферментов целлюлазно-глюканазно-ксилианазного действия,

осуществляет неполный гидролиз холоцеллюлозы мискантуса. Процент гидролиза при концентрации фермента 10 мг/мл составляет $72,0 \pm 3,6$ %. Для полного гидролиза холоцеллюлозы необходимо использование мультиферментной композиции, состоящей из «Целлюлозы Ультра» и ксиланазы (Образец № 4) (процент гидролиза – $92,0 \pm 4,6$ % при концентрации 10 мг/мл). Максимальной биоконверсии биомассы мискантуса в сахара удалось достичь при использовании мультиферментной композиции из «Целлюлозы Ультра», ксиланазы и β -глюканазы (Образец № 6). При пересчете на массу гидролизуемых компонентов степень гидролиза составила $96,0 \pm 4,8$ %, что соответствует $67,2$ % конверсии в пересчете на биомассу.

В связи с тем что в состав ферментной композиции входят ферменты с различным оптимумом действия, проведены исследования по изучению влияния температуры и продолжительности гидролиза на выход редуцирующих веществ в процессе биоконверсии биомассы мискантуса мультиферментной композицией из «Целлюлозы Ультра», ксиланазы и β -глюканазы с концентрацией 10 мг/мл цитратного буфера (Образец № 6), концентрацией субстрата 50 г/л и pH 4,7. Температуру варьировали от 30 до 50 °C (рис. 3).

Анализ данных, представленных на рисунке 3, показал, что максимальное содержание редуцирующих веществ наблюдалось через 72 ± 1 ч и составило $80,00 \pm$

4,00 % при температуре ферментации $30 \pm 1^\circ\text{C}$, $85,00 \pm 4,25$ % при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ и $97,00 \pm 4,85$ % при температуре $50 \pm 1^\circ\text{C}$.

В результате ферментативного гидролиза лигнин гидролизовался до полисахаридов и остаточного, негидролизованного, растворимого и не растворимого в кислоте лигнина. Целлюлоза мискантуса в результате ферментативного гидролиза превращалась в моносахариды.

Результаты исследования полисахаридов и лигнина, полученных ферментативным гидролизом биомассы мискантуса, представленные на рисунке 4, показывают, что сигнал с массой 663,676 m/z соответствует димеру фенилкумароновой кислоты, сигнал с массой 518,523 m/z – димеру 1-(4-метоксифенил) фенил)-2-фенилэтан-1,2-диола, сигнал с массой 449,278 m/z – фрагменту фенокси-фенилкумароновой кислоты.

Анализ табличных данных (табл. 4) позволяет сделать вывод о том, что при времени ферментативного гидролиза биомассы мискантуса 72 ч наблюдалось наименьшее количество негидролизованного лигнина – 42,1 %. Данный факт говорит о том, что при времени гидролиза 72 ч гидролиз лигнина проходит наиболее полно. Наблюдается наибольшее количество полисахаридов, образующихся в процессе ферментативного гидролиза биомассы мискантуса: 38,8 % глюкозы и 7,2 % ксилана.

При времени ферментативного гидролиза 24 ч наблюдается наибольшее количество негидролизованного лигнина – 69,5 %, наименьшее количество глюкозы и ксилана – 18,4 и 2,5 % соответственно.

При времени ферментативного гидролиза биомассы лигнина 48 ч количество негидролизованного лигнина составляло 60,4 %, не растворимого в кислоте лигнина – 57,6 %, растворимого в кислоте лигнина – 1,5 %. Глюкоза образовалась 32,2 %, ксилана – 4,4 %.

При времени ферментативного гидролиза 96 и 120 ч ксилан не обнаружен, а глюкоза образовалась 29,7 и 29,1 % соответственно. Негидролизованного лигнина образовалось 58,9 и 59,1 % соответственно. Не растворимого в кислоте лигнина образовалось 58,8 и 57,4 % соответственно. Растворимого в кислоте лигнина образовалось 1,6 и 1,5 % соответственно.

Таким образом, при оптимальном времени ферментативного гидролиза биомассы мискантуса 72 ч гидролиз идет более полно с наименьшим количеством образовавшегося негидролизованного лигнина и с наибольшим количеством образовавшихся полисахаридов.

Из данных таблицы 5 следует, что в результате ферментативного гидролиза целлюлозы, содержащейся в биомассе мискантуса, при продолжительности 72 ч получается наибольшее количество моносахарида глюкозы – 40,5 % и небольшое количество уроновых кислот – 2,1 %. Ксилозы образуется 24,4 %, что почти

в 10 раз больше образовавшейся арабинозы (2,45 %) и в 48,8 раз больше образовавшейся галактозы (0,5 %).

Как следует из представленных в таблице 6 данных, растение характеризуется массовой долей жировосковой фракции 4,95 %, зольностью 5,82 %, массовой долей кислотонерастворимого лигнина 22,5 %, массовой долей пентозанов 20,9 % и массовой долей целлюлозы 53,3 %. Полученные результаты согласуются с зарубежными данными для различных генотипов мискантуса в части основных компонентов: целлюлозы и лигнина [54, 55].

Универсальность ферментативного гидролиза биомассы мискантуса и достоверность полученных данных подтверждаются исследованиями ведущих ученых [56, 57–59]. В данных работах отмечено, что целлюлозосодержащее сырье считается одним из наиболее перспективных видов сырья для производства биопродуктов с добавленной стоимостью. Однако для реализации технологического процесса ферментативного гидролиза биомассы мискантуса обязательным условием является применение универсальных методов предварительной обработки. В данных работах описано исследование биоконверсии образцов целлюлозы овсяной шелухи и мискантуса путем ферментативного гидролиза. Образцы были получены двухступенчатой обработкой сырья разбавленными растворами азотной кислоты и гидроксида натрия. Ферментативный гидролиз проводили с использованием ферментных препаратов Cellolux-A и Ultraflo Core при исходной концентрации субстрата 40 г/л. На первом этапе изучали реакционную способность субстратов к ферментативному гидролизу в ацетатном буферном растворе в течение 72 ч. Было установлено, что образцы целлюлозы из обоих типов сырья обладают одинаково высокой реакционной способностью в отношении восстанавливающих веществ. Глюкоза, полученная из субстрата, составила 94–95 и 88–91 % соответственно. Это свидетельствует об универсальности применяемого метода предварительной обработки сырья с содержанием целлюлозы 35–45 %. На втором этапе гидролиз субстратов проводили в пилотном ферментере в водной среде с избытком ферментных препаратов. В течение 32 ч были получены водные гидролизаты с концентрацией редуцирующих веществ и глюкозы, равных 42 (выход 94 % из субстрата) и 33–35 г/л (выход 74–78 % из субстрата) соответственно. Содержание глюкозы (79–83 %) и пентозы (1–2 %) в редуцирующих веществах указывает на преобладание глюкозы в составе получаемых растворов. Высокая эффективность биоконверсии дополнительно демонстрируется сравнительным анализом результатов сканирующей электронной спектроскопии для субстратов и остатков после гидролиза в пилотном ферментере. Растворы

глюкозы, полученные в водной среде, становятся перспективным материалом для приготовления питательных сред и синтеза ценных метаболитов [56].

Выводы

В результате исследования подобраны параметры предварительной механической и химической обработки биомассы мискантуса с целью последующего получения углеводсодержащих субстратов для биотехнологии. Установлено, что для предварительной механической обработки биомассы травянистого растения мискантус китайский «Стриктус» (*Miscanthus sinensis* Strictus) рационально применять молотковую дробилку с размером частиц мискантуса 0,2–0,3 мм. При данном виде обработки наблюдается максимальный выход углеводсодержащей биомассы ($62,33 \pm 1,87\%$). Определено, что для химической обработки биомассы мискантуса рационально применять метод делигнификации трифторуксусной кислотой. При данном химическом методе наблюдается максимальное разложение углеводов до глюкозы ($95,72 \pm 2,87\%$) и ксилана ($75,94 \pm 2,27\%$).

В результате проведенных исследований научно обоснованы параметры ферментативного гидролиза предобработанной биомассы мискантуса китайского «Стриктус» для получения углеводсодержащих субстратов и последующего их использования для биосинтеза бактериальной целлюлозы. Состав мультиферментной композиции: «Целлюлаза Ультра», полученная на основе селекционного штамма *Trichoderma reesei* (активность препарата 2500 ед/г), ксиланаза из *Thermomyces lanuginosus* (активность препарата 10 000 ед/г) и β -глюканаза из *Myceliophthorafergusii* (активность препарата 10 000 ед/см³). Температура ферментации 50 ± 1 °С, продолжительность 72 ± 1 ч. При указанных параметрах конверсия холоцеллюлозы биомассы мискантуса составила $96,0 \pm 4,8\%$, выход редуцирующих веществ – $97,0 \pm 4,85\%$.

Установлено, что в результате ферментативного гидролиза целлюлоза, содержащаяся в биомассе мискантуса, распадается до глюкозы, что коррелирует с данными исследования [56].

Анализ углеводного состава гидролизатов, полученных в результате ферментативного гидролиза биомассы мискантуса показал наличие остаточного лигнина, полисахаридов (глюкана и ксилана) и моносахаридов (арабинозы, ксилозы, галактозы, глюкозы и уроновых кислот), как и в исследовании [60].

Углеводсодержащие субстраты, образующиеся при экстракции целлюлозы из биомассы малоценных растений, могут использоваться в следующих направлениях:

1. В качестве компонентов твердых питательных сред для культивирования микроорганизмов.

Питательные среды для выращивания микроорганизмов на основе сельскохозяйственных отходов и малоценных растений имеют высокую рентабельность и являются альтернативой коммерческим средам как для исследовательских целей, так и для микробиологической промышленности [61];

2. В качестве бульонов для культивирования грибов и микроорганизмов. Производство микробной биомассы в жидкой культуре представляет собой обязательный этап до или часть проведения экспериментов с изолятами бактерий или дрожжей. Как правило, производство сред для таких исследований состоит из использования коммерчески производимых порошкообразных сред или сред, состоящих из определенных количеств очищенного углерода, азота и источников питательных веществ. Однако стоимость этих коммерчески приготовленных питательных или очищенных компонентов сред высока и может стать серьезным препятствием для проведения исследований в местах, где получение этих продуктов затруднено. Известны случаи успешного применения водных экстрактов растительных отходов для выращивания микроскопических грибов [62];

3. В качестве питательных бульонов для производства бактериальной целлюлозы. Бактериальная целлюлоза представляет собой линейный гомополимер, который состоит из d-глюкопиранозы, связанной с β -1,4 связями и может быть синтезирован с природными или генетически модифицированными микроорганизмами. По сравнению с растительной целлюлозой бактериальная представляет собой химически чистую целлюлозу. Несмотря на то, что бактериальная целлюлоза очень востребована в различных областях применения, ее производство является дорогостоящим процессом: стоимость синтетических питательных сред может составлять до 65 % от общей стоимости процесса. Одним из таких решений в мировой практике стало использование питательных бульонов на основе дешевого целлюлозного сырья для получения высокоценной бактериальной целлюлозы [63];

4. Углеводсодержащие субстраты имеют в своем составе простые и сложные сахара, которые могут метаболизироваться микроорганизмами с выделением биоэтанола. Использование углеводсодержащей биомассы в качестве источника биотоплива, в частности биоэтанола, является одним из предварительных условий устойчивого развития. По сравнению с другими возобновляемыми источниками энергии биоэтанол имеет несколько уникальных преимуществ, таких как применение в качестве

жидкого топлива, которое можно использовать в существующих двигателях транспортных средств, и распределение через существующую систему ископаемого топлива, а также он способствует развитию сельской экономики [64].

Критерии авторства

Фактический вклад каждого автора
О. Б. Калашикова – 20 %, Е. А. Буденкова – 20 %, Е. В. Ульрих – 20 %, Е. Г. Чупахин – 10 %, О. В. Кригер – 10 %, Я. А. Масютин – 5 %, М. А. Смага – 10 %, Ю. С. Басова – 5 %.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Contribution

О.В. Kalashnikova – 20%, Е.А. Budenkova – 20%, Е.В. Ulrikh – 20%, Е.Г. Chupakhin – 10%, О.В. Kriger – 10%, Ya.A. Masiutin – 5%, М.А. Smaga – 10%, Yu.S. Basova – 5%.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.

References/Список литературы

1. Anisimov AA, Khokhlov NF, Tarakanov IG. Miscanthus (*Miscanthus* spp.) in Russia: opportunities and prospects. New and non-traditional plants and application prospects. 2016;12:3–5. (In Russ.).
Анисимов А. А., Хохлов Н. Ф., Тараканов И. Г. Мискантус (*Miscanthus* spp.) в России: возможности и перспективы // Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования. 2016. № 12. С. 3–5.
2. Anisimov AA, Khokhlov NF, Tarakanov IG. Photoperiodic regulation of ontogenesis in different miscanthus species (*Miscanthus* spp.). Izvestiya of Timiryazev Agricultural Academy. 2016;(6):56–72. (In Russ.).
Анисимов А. А., Хохлов Н. Ф., Тараканов И. Г. Особенности фотопериодической регуляции онтогенеза у различных видов мискантуса (*Miscanthus* spp.) // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. 2016. № 6. С. 56–72.
3. Baibakova OV, Skiba EA. Biotechnological view of ethanol biosynthesis from miscanthus. Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2014;18(3):564–571. (In Russ.).
Байбакова О. В., Скиба Е. А. Биотехнологические аспекты биосинтеза этанола из мискантуса // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2014. Т. 18. № 3. С. 564–571.
4. Buryndin VG, Artyemov AV, Savinovskih AV, Krivonogov PS, Krivonogova AS. Biostability of binder-free wood and plant plastics protected with antiseptics. Foods and Raw Materials. 2022;10(1):148–154. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2022-1-148-154>
5. Vazetdinova AA, Kharina MV, Loginova IV, Kleschevnikov LI. Enzymatic hydrolysis of cellulosic residuals of furfural production from vegetable raw materials. Bashkir Chemistry Journal. 2017;24(1):27–31. (In Russ.).
Ферментализ целлюлозосодержащих остатков производства фурфуrolа из отходов растительного сырья / А. А. Вазетдинова [и др.] // Башкирский химический журнал. 2017. Т. 24. № 1. С. 27–31.
6. Gushchina VA, Borisova EN. Growth and development of first year *Miscanthus giganteus* depending on hydrothermal conditions. Vestnik of Ulyanovsk State Agricultural Academy. 2017;37(1):12–18. (In Russ.). <https://doi.org/10.18286/1816-4501-2017-1-12-18>
7. Gushina VA, Kukharev ON, Borisova YeN. Methods of weed control of miscanthus giant in agrocenoses. Volga Region Farmland. 2017;43(2):13–18. (In Russ.).
Гушина В. А., Кухарев О. Н., Борисова Е. Н. Способы борьбы с сорняками в агроценозах мискантуса гигантского // Нива Поволжья. 2017. Т. 43. № 2. С. 13–18.
8. Budaeva VV, Skiba EA, Baybakova OV, Makarova EI, Orlov SE, Kukhlenko AA, et al. Kinetics of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials at different concentrations of substrat. Catalysis in Industry. 2015;(5):60–66. (In Russ.). <https://doi.org/10.18412/1816-0387-2015-5-60-66>
9. Makarova EI, Budaeva VV. Bioconversion of non-food cellulosic biomass. Part 1. Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology. 2016;6(2):43–50. (In Russ.). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2016-6-2-43-50>
10. Gushina VA, Volodkin AA, Ostroborodova NI, Agapkin ND, Letuchiy AV. Peculiarities of growth and development of introduction of miscanthus gi-ganteus in the conditions of forest-step zone in Middle Volga. The Agrarian Scientific Journal. 2018;(1):10–13. (In Russ.).
Особенности роста и развития интродуцента мискантуса гигантского (*Miscanthus giganteus*) в условиях лесостепи среднего Поволжья / В. А. Гушина [и др.] // Аграрный научный журнал. 2018. № 1. С. 10–13.

11. Dorogina OV, Vasilyeva OYu, Nuzhdina NS, Buglova LV, Gismatulina YuA, Zhmud EV, et al. Resource potential of some species of the genus *Miscanthus Anderss.* Under conditions of continental climate of West Siberian forest-steppe. Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(5):553–559. (In Russ.). <https://doi.org/10.18699/VJ18.394>
12. Voronova MI, Surov OV, Rubleva NV, Kochkina NE, Prusova SM, Gismatulina YuA, et al. Properties of nanocrystalline cellulose obtained from celluloses of annual plants. Liquid Crystals and their Application. 2017;17(4):97–105. (In Russ.). <https://doi.org/10.18083/LCAppl.2017.4.97>
13. Kapustyanchik SYu, Yakimenko VN. Miscanthus is promising raw material, energy and phytomeliorative crop (literature review). The Journal of Soils and Environment. 2020;3(3). (In Russ.). <https://doi.org/10.31251/pos.v3i3.126>
14. Zapater M, Catterou M, Mary B, Ollier M, Fingar L, Mignot E, et al. A single and robust critical nitrogen dilution curve for *Miscanthus × giganteus* and *Miscanthus sinensis*. Bioenergy Research. 2017;10(1):115–128. <https://doi.org/10.1007/s12155-016-9781-8>
15. Asano K, Ishida M, Ishida M. Effects of inclusion levels of pelleted silvergrass (*Miscanthus sinensis* Anderss.) in the diet on digestibility chewing activity ruminal fermentation and blood metabolites in breeding Japanese Black cows. Animal Science Journal. 2017;88(3):468–475. <https://doi.org/10.1111/asj.12665>
16. Ashman C, Awty-Carroll D, Mos M, Robson P, Clifton-Brown J. Assessing seed priming sowing date and mulch film to improve the germination and survival of direct-sown *Miscanthus sinensis* in the United Kingdom. GCB Bioenergy. 2018;10(9):612–627. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12518>
17. Baibakova OV. Effects of the pre-treatment of the miscanthus energy crop on the ethanol yield. Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology. 2018;8(3):79–84. (In Russ.). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2018-8-3-79-84>
18. Saletnik B, Zagula G, Bajcar M, Czernicka M, Puchalski C. Biochar and biomass ash as a soil ameliorant: The effect on selected soil properties and yield of giant miscanthus (*Miscanthus × giganteus*). Energies. 2018;11(10). <https://doi.org/10.3390/en11102535>
19. Hu Y, Schäfer G, Duplay J, Kuhn NJ. Bioenergy crop induced changes in soil properties: A case study on *Miscanthus* fields in the Upper Rhine Region. PLoS ONE. 2018;13(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200901>
20. Nakajima T, Yamada T, Anzoua KG, Kokubo R, Noborio K. Carbon sequestration and yield performances of *Miscanthus × giganteus* and *Miscanthus sinensis*. Carbon Management. 2018;9(4):415–423. <https://doi.org/10.1080/17583004.2018.1518106>
21. Cayetano RDA, Kim TH. Two-stage processing of *Miscanthus giganteus* using anhydrous ammonia and hot water for effective xylan recovery and improved enzymatic saccharification. Bioresource Technology. 2018;255:163–170. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.135>
22. El Achaby M, El Miri N, Hannach H, Gmouh S, Trabadelo V, Aboulkas A, et al. Cellulose nanocrystals from *Miscanthus* fibers: insights into rheological physico-chemical properties and polymer reinforcing ability. Cellulose. 2018;25(11):6603–6619. <https://doi.org/10.1007/s10570-018-2047-1>
23. Schäfer J, Sattler M, Iqbal Y, Lewandowski I, Bunzel M. Characterization of *Miscanthus* cell wall polymers. GCB Bioenergy. 2019;11(1):191–205. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12538>
24. Bilska-Kos A, Panek P, Szulc-Głaz A, Ochodzki P, Cisło A, Zebrowski J. Chilling-induced physiological anatomical and biochemical responses in the leaves of *Miscanthus × giganteus* and maize (*Zea mays* L.). Journal of Plant Physiology. 2018;228:178–188. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.05.012>
25. Li Y-H, Lin H-T, Xiao K-L, Lasek J. Combustion behavior of coal pellets blended with *Miscanthus* biochar. Energy. 2018;163:180–190. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2018.08.117>
26. Baute K, Van Eerd LL, Robinson DE, Sikkema PH, Mushtaq M, Gilroyed BH. Comparing the biomass yield and biogas potential of *Phragmites australis* with *Miscanthus × giganteus* and *Panicum virgatum* grown in Canada. Energies. 2018;11(9). <https://doi.org/10.3390/en11092198>
27. Danielewicz D, Dybka-Stępień, Katarzyna;Surma-Ślusarska, B. Processing of *Miscanthus × giganteus* stalks into various soda and kraft pulps. Part I: Chemical composition, types of cells and pulping effects. Cellulose. 2018;25(11):6731–6744. <https://doi.org/10.1007/s10570-018-2023-9>
28. Dhungana P, Reichert NA. Development of transformation and regeneration procedures for *Miscanthus sinensis*. In Vitro Biology Meeting. St. Louis; 2018. p. S49.
29. Tamura K, Uwatoko N, Yamashita H, Fujimori M, Akiyama Y, Shoji A, et al. Discovery of natural interspecific hybrids between *Miscanthus sacchariflorus* and *Miscanthus sinensis* in Southern Japan: Morphological characterization genetic structure and origin. Bioenergy Research. 2016;9(1):315–325. <https://doi.org/10.1007/s12155-015-9683-1>
30. Turner AP, Sama MP, Bryson LS, Montross MD. Effect of stem crushing on the uniaxial bulk compression behaviour of switchgrass and miscanthus. Biosystems Engineering. 2018;175:52–62. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2018.08.007>
31. Guo H, Wu Y, Hong C, Chen H, Chen X, Zheng B, et al. Enhancing digestibility of *Miscanthus* using lignocellulolytic enzyme produced by *Bacillus*. Bioresource Technology. 2017;245:1008–1015. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.034>

32. Yoo JH, Seong ES, Ghimire BK, Heo K, Jin X, Yamada T, *et al.* Establishment of *Miscanthus sinensis* with decreased lignin biosynthesis by *Agrobacterium*-mediated transformation using antisense *COMT* gene. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2018;133(3):359–369. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1389-6>
33. Guo H, Chen H, Hong C, Jiang D, Zheng B. Exogenous malic acid alleviates cadmium toxicity in *Miscanthus sacchariflorus* through enhancing photosynthetic capacity and restraining ROS accumulation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2017;141:119–128. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.03.018>
34. Evdokimov IV. Methods for measuring biomass of soil microorganisms. *Russian Journal of Ecosystem Ecology*. 2018;3(3). (In Russ.). <https://doi.org/10.21685/2500-0578-2018-3-5>
35. Samson A, Mos M, Najser J, Daroch M, Gallagher J. Gasification of *Miscanthus × giganteus* pellets in a fixed bed pilot-scale unit. *Frontiers in Energy Research*. 2018;6. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2018.00091>
36. Gismatulina YuA, Budaeva VV. Chemical composition of five *Miscanthus sinensis* harvests and nitric-acid cellulose therefrom. *Industrial Crops and Products*. 2017;109:227–232. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.08.026>
37. Gontarenko SM, Lashuk SO. Obtaining plant *Miscanthus sacchariflorus* (Maxim.) Hack and *Miscanthus sinensis* Andersson *in vitro* culture by indirect morphogenesis. *Plant Varieties Studying and Protection*. 2017;13(1):12–19. (In Ukr.).
Гонтаренко С. Н., Лашук С. А. Получение растений *Miscanthus sacchariflorus* (Maxim.) Hack и *Miscanthus sinensis* Andersson в культуре *in vitro* путем непрямого морфогенеза. *Plant Varieties Studying and Protection*. 2017. Т. 13. № 2. С. 12–19. (На укр.).
38. Hiden A. Thermal degradation behavior of Ball-milled *Miscanthus* plants and its relationship to enzymatic hydrolysis. *Bioresources*. 2018;13(3):6383–6395.
39. Mihajlović M, Petrović J, Maletić S, Isakovski MK, Stojanović M, Lopičić Z, *et al.* Hydrothermal carbonization of *Miscanthus × giganteus*: Structural and fuel properties of hydrochars and organic profile with the ecotoxicological assessment of the liquid phase. *Energy Conversion and Management*. 2018;159:254–263. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2018.01.003>
40. Che Kamarludin SN, Jainal MS, Azizan A, Safaai NSM, Daud ARM. Mechanical pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuel production. *Applied Mechanics and Materials*. 2014;625:838–841. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMM.625.838>
41. Mayer-Laigle C, Blanc N, Rajaonarivony RK, Rouau X. Comminution of dry lignocellulosic biomass, a review: Part I. From fundamental mechanisms to milling behaviour. *Bioengineering*. 2018;5(2). <https://doi.org/10.3390/bioengineering5020041>
42. Mayer-Laigle C, Rajaonarivony RK, Blanc N, Rouau X. Comminution of dry lignocellulosic biomass: Part II. Technologies, improvement of milling performances, and security issues. *Bioengineering*. 2018;5(3). <https://doi.org/10.3390/bioengineering5030050>
43. Moiceanu G, Paraschiv G, Voicu G, Dinca M, Negoita O, Chitoiu M, *et al.* Energy consumption at size reduction of lignocellulose biomass for bioenergy. *Sustainability*. 2019;11(9). <https://doi.org/10.3390/su11092477>
44. Kriger O, Budenkova E, Babich O, Suhir S, Patyukov N, Masyutin Ya, *et al.* The process of producing bioethanol from delignified cellulose isolated from plants of the miscanthus genus. *Bioengineering*. 2020;7(2). <https://doi.org/10.3390/bioengineering7020061>
45. Choi O, Kang B, Cho SK, Park J, Lee Y, Kim W-I, *et al.* Identification of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* causing bacterial leaf blight of *Miscanthus sinensis*. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 2017;124(1):97–100. <https://doi.org/10.1007/s41348-016-0058-4>
46. Hoover A, Emerson R, Ray A, Stevens D, Morgan S, Cortez M, *et al.* Impact of drought on chemical composition and sugar yields from dilute-acid pretreatment and enzymatic hydrolysis of *Miscanthus*, a tall fescue mixture, and switchgrass. *Frontiers in Energy Research*. 2018;6. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2018.00054>
47. Kowalczyk-Jusko A. Chemical composition and energetic characteristics of *Miscanthus sacchariflorus* biomass as used for generation of energy. *Przemysl Chemiczny*. 2016;95(11):2326–2329. <https://doi.org/10.15199/62.2016.11.37>
48. Lanzerstorfer C. Chemical composition and properties of ashes from combustion plants using *Miscanthus* as fuel. *Journal of Environmental Sciences*. 2017;54:178–183. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2016.03.032>
49. Lanzerstorfer C. Combustion of *Miscanthus*: Composition of the ash by particle size. *Energies*. 2019;12(1). <https://doi.org/10.3390/en12010178>
50. Lee S, Han J, Ro Hee-M. Interpreting the pH-dependent mechanism of simazine sorption to *Miscanthus* biochar produced at different pyrolysis temperatures for its application to soil. *Korean Journal of Chemical Engineering*. 2018;35(7):1468–1476. <https://doi.org/10.1007/s11814-018-0054-4>
51. Schmidt A, Lemaigre S, Ruf T, Delfosse P, Emmerling C. *Miscanthus* as biogas feedstock: influence of harvest time and stand age on the biochemical methane potential (BMP) of two different growing seasons. *Biomass Conversion and Biorefinery*. 2018;8(2):245–254. <https://doi.org/10.1007/s13399-017-0274-6>
52. Dąbkowska K, Alvarado-Morales M, Kuglarz M, Angelidaki I. *Miscanthus* straw as substrate for biosuccinic acid production: Focusing on pretreatment and downstream processing. *Bioresource Technology*. 2019;278:82–91. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.051>

53. Moon Y-H, Lee, J-E, Yu G-D, Song Y-S, Lee Y-H, Kim K-S, et al. Ploidy level and reproductive organ abnormality in interspecific hybrids between tetraploid *Miscanthus sacchariflorus* and diploid *M. sinensis* bred from a single cross. *Industrial Crops and Products*. 2018;116:182–190. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.01.022>
54. Brosse N, Dufour A, Meng X, Sun Q, Ragauskas A. *Miscanthus*: a fast-growing crop for biofuels and chemicals production. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. 2012;6(5):580–598. <https://doi.org/10.1002/bbb.1353>
55. Jones MB, Walsh M. *Miscanthus*: For energy and fibre. Earthscan; 2001. 192 p.
56. Kashcheyeva EI, Mironova GF, Budaeva VV, Khan H. Bioconversion of oat hull and miscanthus cellulose to glucose solutions. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2019;9(4):654–664. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-4-654-664>
57. Gismatulina YuA, Budaeva VV, Sakovich GV. Nitrocellulose synthesis from *Miscanthus* cellulose. *Propellants, Explosives, Pyrotechnics*. 2018;43(1):96–100. <https://doi.org/10.1002/prop.201700210>
58. Yang H, Zhang Y, Kato R, Rowan SJ. Preparation of cellulose nanofibers from *Miscanthus* × *Giganteus* by ammonium persulfate oxidation. *Carbohydrate Polymers*. 2019;212:30–39. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.02.008>
59. Kalinoski RM, Flores HD, Thapa S, Tuegel ER, Bilek MA, Reyes-Mendez EY, et al. Pretreatment of hardwood and *Miscanthus* with *Trametes versicolor* for bioenergy conversion and densification strategies. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2017;183(4):1401–1413. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2507-3>
60. Davey CL, Jones LE, Squance M, Purdy SJ, Maddison AL, Cunniff J, et al. Radiation capture and conversion efficiencies of *Miscanthus sacchariflorus*, *M. sinensis* and their naturally occurring hybrid *M. × giganteus*. *GCB Bioenergy*. 2017;9(2):385–399. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12331>
61. Redcay S, Koirala A, Liu J. Effects of roll and flail conditioning systems on mowing and baling of *Miscanthus* × *giganteus* feedstock. *Biosystems Engineering*. 2018;172:134–143.
62. Sarkar A, Asaeda T, Wang Q, Kaneko Y, Rashid H. Response of *Miscanthus sacchariflorus* to zinc stress mediated by arbuscular mycorrhizal fungi. *Flora*. 2017;234:60–68. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2017.05.011>
63. Seibert-Ludwig D, Hahn T, Hirth T, Zibek S. Selection and optimization of a suitable pretreatment method for miscanthus and poplar raw material. *GCB Bioenergy*. 2019;11(1):171–180. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12575>
64. Grams J, Kwapińska M, Jędrzejczyk M, Rzeźnicka I, Leahy JJ, Ruppert AM. Surface characterization of *Miscanthus* × *giganteus* and *Willow* subjected to torrefaction. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. 2019;138:231–241. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2018.12.028>