

УДК 674.038,630.863

ПРЕДОБРАБОТКА ТРОСТНИКА С ПОМОЩЬЮ ГЛУБОКИХ ЭВТЕКТИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ ДЛЯ УВЕЛИЧЕНИЯ ЕГО ГИДРОЛИЗУЕМОСТИ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЦЕЛЛЮЛАЗ

© 2023 г. М. В. Семенова¹ *, И. С. Васильева¹, А. И. Ярополов¹, А. П. Сеницын¹

¹Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии”
Российской академии наук (ФИЦ Биотехнологии РАН), Москва, 119071 Россия

*e-mail: margo@mail.ru

Поступила в редакцию 15.11.2022 г.

После доработки 16.12.2022 г.

Принята к публикации 09.01.2023 г.

Проведена предобработка тростника рядом глубоких эвтектических растворителей (ГЭР) на основе холина хлорида (ХХл) в качестве акцептора водородной связи. Среди доноров водородной связи наиболее эффективными были молочная (МК) и щавелевая кислоты (ЩК). Оптимизированы условия предобработки тростника (соотношение компонентов ГЭР, температура и время воздействия), приводящие к наибольшему выходу восстанавливающих сахаров (ВС) и глюкозы в ходе его гидролиза целлюлазным ферментным препаратом (ФП) на основе *Penicillium verruculosum*. Установлено, что при использовании смеси ХХл и МК (молярное соотношение компонентов 1 : 5) наиболее эффективна предобработка при температуре 80°C в течение 24 ч, а при использовании смеси ХХл и ЩК (молярное соотношение 1 : 1) – при 80°C в течение 6 ч. При этом глубина последующего ферментативного гидролиза предобработанного тростника после 48 ч выдерживания в присутствии ФП *P. verruculosum* В537 составляла 80 и 86% по сухой массе для выбранных смесей ХХл/МК и ХХл/ЩК соответственно.

Ключевые слова: тростник, “зеленая” химия, глубокие эвтектические растворители, гидролиз, целлюлазы, *Penicillium verruculosum*

DOI: 10.31857/S0555109923030169, **EDN:** BELOAR

Возобновляемая целлюлозосодержащая растительная биомасса является привлекательным сырьем для производства биоэтанола и других полезных продуктов из-за низкой стоимости, изобилия и отсутствия конкуренции с продуктами питания. Традиционная схема переработки растительной биомассы включает измельчение, предварительную обработку, ферментативный гидролиз (осахаривание), ферментацию (брожение) и дистилляцию. Предварительная обработка необходима для снижения устойчивости биомассы к воздействию гидролитических ферментов, обусловленной наличием лигниновой матрицы и кристаллическим состоянием целлюлозы – факторов, препятствующих эффективному гидролизу целлюлазами [1]. Для увеличения реакционной способности биомассы используются различные методы ее предварительной обработки, направленные на разрушение кристаллической структуры целлюлозы, удаление лигнина и увеличение площади поверхности целлюлозы, доступной ферментам. Несмотря на то, что эти методы приводят к увеличению реакционной способности биомассы, они остаются

несовершенными с точки зрения “зеленой химии” и экологичности процесса [2, 3].

Альтернативой могут быть методы предобработки, основанные на использовании глубоких эвтектических растворителей (ГЭР) – они существенно увеличивают реакционную способность сырья [4]. ГЭР обладают рядом преимуществ по сравнению с обладающими теми же характеристиками ионными жидкостями (ИЖ) [5]: простота синтеза, стабильность, конкурентоспособность по цене (согласно примерной оценке стоимость синтеза ГЭР в 5–10 раз ниже стоимости ИЖ [6]), широкой доступностью (например, холин хлорид, ХХл, используется в качестве кормовой добавки при кормлении сельскохозяйственных животных и птицы) и безвредностью для окружающей среды [7].

Термин ГЭР был впервые введен в работе [8]. В зависимости от типа компонентов, участвующих в образовании эвтектической смеси, на сегодняшний день ГЭР подразделяются на четыре типа [9, 10]. Для целей биотехнологии наиболее перспективны ГЭР третьего типа, которые состоят из

акцепторов водородной связи (соли четвертичного аммония или фосфония) и доноров водородной связи (карбоновые кислоты, амиды, спирты и др.). Водородные связи приводят к делокализации заряда между донором и акцептором и температура плавления эвтектической смеси намного ниже по сравнению с индивидуальными соединениями. Наибольший интерес для предобработки растительной биомассы вызывают ГЭР, которые остаются жидкими при комнатной температуре или умеренном нагреве, что не препятствует процессам смешивания и массообмена с твердым растительным сырьем [11].

Важной характеристикой ГЭР является его вязкость, на которую могут влиять разные факторы, включая химическую природу компонентов ГЭР, их молярное соотношение, температура, содержание воды. Например, вязкость ГЭР на основе ХХл уменьшается с повышением температуры и содержания ХХл в определенном диапазоне [12].

Одним из требований к использованию ГЭР для предобработки содержащей целлюлозу биомассы является его способность растворять лигнин. Последний ограничивает ферментативный гидролиз, действуя как физический барьер, препятствуя доступу ферментов к полисахаридному субстрату, а также путем непродуктивного связывания ферментов [13, 14]. Было показано, что кислотные ГЭР (на основе молочной, яблочной, щавелевой и других кислот) наиболее эффективны в данном процессе и приводят к удалению более 90% лигнина из разных видов лигноцеллюлозной биомассы (кукурузных початков, рисовой соломы, лиственной и хвойной древесины) [15, 16].

Тростник относится к злакам, поэтому содержание лигнина в нем велико – от 18 до 26% в разных частях растения. Легкогидролизуемые полисахариды (в основном ксиланы) составляют 20–30%, трудногидролизуемые (целлюлоза) – 19–37% [17]. Варьированием состава ГЭР, температуры и времени предобработки возможно максимально увеличить гидролизуемость массы тростника путем уменьшения содержания в нем лигнина и увеличения доступности целлюлозы для ферментов.

Цель настоящей работы – подбор условий предобработки тростника южного (или обыкновенного), широко распространенного в низовьях Волги.

МЕТОДИКА

Ферментные препараты. В работе были использованы ФП, которые представляли собой лиофильно высушенные культуральные жидкости, полученные на основе штаммов *P. verruculosum* B537 (продуцент целлюлазы) [18] и *P. verruculosum* F-10 (продуцент β -глюкозидазы) [19].

Реагенты. В работе использовали тростник обыкновенный из Астраханской области (Россия), грубо измельченный. В качестве субстратов для определения активностей использовали Na-соль карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ), ксилан бука, *n*-нитрофенил- β -глюкопиранозид (пНФГ) – производства “Sigma” (США) и микрокристаллическую целлюлозу (МКЦ, ТУ 20.16.59-001-40693384-209) производства “Кристалл” (Россия). Для приготовления буферных смесей и солевых растворов использовали реактивы фирм “Bio-Rad Laboratories” (США), “Panreac” (Германия), “Helicon” и “Реахим” (Россия). Для получения ГЭР использовали ХХл (“Molekula”, Англия), глицерин (“Panreac Quimica”, Испания), этиленгликоль (“Roth”, Германия), молочную кислоту (МК) (“Acros Organics”, Бельгия), щавелевую кислоту (ЩК) (“ХимМед”, Россия).

Получение ГЭР. Все ГЭР получали путем термического смешивания компонентов при постоянном перемешивании в течение 6 ч: ХХл/МК (молярные соотношения 1 : 2 и 1 : 5) – при 40°C; ХХл/ЩК (молярные соотношения 1 : 1 и 1 : 2) – при 60°C; ХХл/пропионовая кислота (молярное соотношение 1 : 2) – при 40°C; ХХл/глицерин (молярное соотношение 1 : 2) – при 50°C; ХХл/этиленгликоль (молярное соотношение 1 : 2) – при 40°C.

Предобработка тростника ГЭР. Для выбора оптимальных условий предобработки использовали ГЭР различного состава: нейтральные на основе ХХл и многоатомных спиртов: глицерин, этиленгликоль и кислые на основе ХХл и кислот: МК, ЩК, пропионовая. Также варьировали время и температуру предобработки. В типичном эксперименте к 500 мг тростника добавляли 9.5 г ГЭР (загрузка 5% по массе) и прогревали при различных температурах в течение 1, 2, 3, 6, 7, 9, 12 или 24 ч при перемешивании. Растворы охлаждали до комнатной температуры и добавляли по 10 мл 50% водно-этанольного раствора. Смесь перемешивали, затем центрифугировали при 7000 g. Надосадочную жидкость, содержащую лигнин и компоненты ГЭР, отделяли, осадок многократно промывали водно-этанольной смесью. Следует отметить, что используемый в работе ГЭР ХХл/ЩК (молярное соотношение 1 : 2) при комнатной температуре затвердевал, что затрудняло его отделение от продуктов делигнификации биомассы.

Выход субстрата после предобработки определяли как отношение массы предобработанного тростника после высушивания до постоянного веса к массе исходного тростника (500 мг).

Определение активности и концентрации ферментов. За 1 ед. активности принимали такое количество фермента, которое катализирует образование 1 мкмоль продукта за 1 мин.

Таблица 1. Выход субстрата после предобработки и результаты последующего ферментативного гидролиза тростника, предобработанного ГЭР на основе ХХл (акцептор водородной связи) и разных доноров водородной связи (условия предобработки 7 ч при 90°С)

Донор водородной связи	Молярное соотношение (акцептор : донор)	Выход субстрата, %	Концентрация, г/л		ГФГ, %
			ВС	глюкоза	
Контроль*	—	—	2.3 ± 0.2	2.1 ± 0.1	6
Молочная кислота	1 : 2	61	15.7 ± 0.8	14.4 ± 0.7	39
	1 : 5	57	18.4 ± 0.9	16.0 ± 0.8	46
Щавелевая кислота	1 : 1	49	18.0 ± 0.9	17.4 ± 0.8	45
	1 : 2	44	3.5 ± 0.3	3.4 ± 0.2	9
Пропионовая кислота	1 : 2	92	8.2 ± 0.6	7.2 ± 0.3	21
Глицерин	1 : 2	93	3.7 ± 0.2	3.6 ± 0.2	9
Этиленгликоль	1 : 2	90	5.5 ± 0.3	5.2 ± 0.3	14

* Контроль — тростник без предобработки.

Активность по отношению к МКЦ, КМЦ и ксилану определяли по скорости накопления ВС, анализируемых методом Шомоди-Нельсона; активность по отношению к пНФГл — по скорости накопления *n*-нитрофенола [20].

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

Ферментативный гидролиз предобработанного тростника. Гидролиз субстрата (40 г/л по сухой массе в реакционной смеси) проводили под действием двух препаратов ФП В537 (10 мг белка/г субстрата или 0.4 мг/мл в реакционной смеси) и β-глюкозидазы ФП F10 (1 мг белка/г субстрата или 0.04 мг/мл реакционной смеси) в пробирках объемом 2 мл (объем реакционной смеси 1.5 мл) в термостатируемом шейкере. Процесс гидролиза вели в присутствии 0.1 г/л антибиотика ампициллина (“Белмедпрепараты”, Республика Беларусь) в 0.1 М Na-ацетатном буферном растворе pH 5.0 и 50°С.

Из реакционной смеси отбирали аликвоты, в которых определяли концентрацию ВС методом Шомоди-Нельсона и глюкозы с помощью набора “Глюкоза-АГАТ” (ООО “АГАТ”, Россия).

Глубину ферментативного гидролиза (ГФГ) рассчитывали, как отношение концентрации ВС после 48 ч ферментативного гидролиза к исходной концентрации субстрата (40 г/л).

Эксперимент проводился в трех повторах.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Предобработка субстрата должна удовлетворять важному условию — эффективно удалять негидролизующую ферментами часть (лигнин), сохраняя целлюлозу и, при необходимости, гемицеллюлозу. Высокие значения выхода предобработанного субстрата 90–93% при использовании пропионо-

вой кислоты, глицерина или этиленгликоля в качестве донора водородной связи в ГЭР (табл. 1) свидетельствовали, по-видимому, о неполном удалении лигнина из тростника в ходе его предобработки. При использовании МК выход субстрата в ходе предобработки составил 57–61%, что указывало на эффективную делигнификацию и, вероятно, частичное удаление гемицеллюлозы. Использование ЩК также приводило к удалению лигнина и части гемицеллюлозы в ходе предобработки, выход субстрата составил 44–49%.

На следующем этапе был проведен ферментативный гидролиз полученного предобработанного субстрата. Целлюлазный комплекс ферментов, способный к глубокому гидролизу целлюлозосодержащего сырья до глюкозы, должен включать в себя три основные группы ферментов: целлобиогидролазы, эндоглюканызы и β-глюкозидазы [1]. Для осуществления биоконверсии предобработанного тростника были использованы ФП на основе штамма *P. verruculosum* В537 [18], содержащий ≈60% целлобиогидролаз и ≈10% эндоглюканаз. ФП В537 обладал высокими удельными активностями по отношению к МКЦ (860 ед./г белка) и КМЦ (1300 ед./г белка), обусловленными наличием целлобиогидролаз и эндоглюканаз соответственно. Однако ФП В537 обеднен β-глюкозидазой, о чем свидетельствуют низкое содержание этого фермента (2%) и невысокая активность по отношению к специфическому для β-глюкозидазы субстрату пНФГ (1800 ед./г белка). Для увеличения β-глюкозидазной активности в реакционную смесь добавляли ФП на основе штамма *P. verruculosum* F10 [19] — продуцента β-глюкозидазы, содержащий около 80% этого фермента и характеризующийся высокой активностью по отношению к пНФГ (6110 ед./г белка). Гидролиз целлюлозосодержащего сырья под действием двух ФП В537

(целлобиогидролазы и эндоглюканазы) и ФП F10 (β -глюкозидаза) приводил к высоким выходам глюкозы [21].

Кроме того, ФП B537 содержал ксиланазу (3%) и обладал высокой активностью к ксилану (1980 ед./г белка), что свидетельствует о способности данного препарата гидролизовать гемицеллюлозы.

Важно отметить, что исходный (без предобработки) тростник обладал очень низкой реакционной способностью: после 48 ч ферментативного гидролиза под действием двух ФП B537 и ФП F10 концентрация ВС составила около 2 г/л, что соответствовало ГФГ всего 6%.

При варьировании состава ГЭР предобработку тростника вели при 90°C в течение 7 ч (табл. 1). Наилучшие результаты были получены для смесей ХХл/МК (соотношение 1 : 5 было предпочтительней соотношения 1 : 2) и ХХл/ЩК (соотношение 1 : 1). После 48 ч ферментативного гидролиза концентрация ВС составила около 18 г/л (ГФГ 46%), концентрация глюкозы – 16–17 г/л. При использовании для предобработки смеси ХХл/ЩК с большей долей ЩК (молярное соотношение 1 : 2) полученный предобработанный субстрат имел крайне низкую реакционную способность и ГФГ составила всего 9%, что, возможно, связано со слишком жесткими условиями предобработки.

Среди использованных в работе ГЭР на основе ХХл с органическими кислотами ГЭР с пропионозой кислотой был наименее эффективным: концентрация ВС и глюкозы составили 8.2 и 7.2 г/л соответственно, ГФГ 21%.

Предобработка тростника смесями ХХл с глицерином или этиленгликолем приводила к увеличению доступности субстрата для ферментов и ГФГ после 48 ч гидролиза составляла 9 и 14% соответственно.

Таким образом, очевидно, что использование органических кислот в качестве донора водородной связи в ГЭР по сравнению с полиспиртами более эффективно. Оптимальными смесями для предобработки были выбраны ХХл/МК (молярное соотношение 1 : 5) и ХХл/ЩК (молярное соотношение 1 : 1).

На следующем этапе были подобраны оптимальные температура и время предобработки тростника для выбранных ГЭР. На рис. 1 показаны выходы продуктов ферментативного гидролиза (ВС и глюкозы) тростника, предобработанного смесями ХХл/МК при 60, 80 и 90°C или ХХл/ЩК при 70, 80 и 90°C за различные промежутки времени (1–24 ч).

При предобработке тростника смесью ХХл/МК его гидролиземость увеличивалась с увеличением времени предобработки (до 24 ч). Наибольший выход продуктов ферментативного гидролиза был получен для субстрата, предобработанного при 80°C в течение 24 ч: концентрация ВС и глюкозы

составили 32 и 27 г/л соответственно, ГФГ 80% (рис. 1б). После 24 ч предобработки тростника при 90°C последующий ферментативный гидролиз был менее эффективен, ГФГ 60% (рис. 1в). Однако при небольшом времени (3–6 ч) предобработка при температуре 90°C была эффективнее по сравнению с 80°C. Предобработка тростника смесью ХХл/МК при 60°C была малоэффективной: ГФГ субстрата, предобработанного в течение 24 ч, составила всего 21% (рис. 1а).

Зависимость степени гидролиза полисахаридов тростника от времени его предобработки смесью ХХл/ЩК при 80 и 90°C имела колоколообразную форму с максимумами при 6 ч при 80°C и 2–3 ч при 90°C (рис. 1д и 1е). При этом наибольший выход продуктов ферментативного гидролиза наблюдался для субстрата, предобработанного в течение 6 ч при 80°C: концентрация ВС составила 34 и глюкозы 33 г/л, ГФГ 86% (рис. 1д). При более высокой температуре предобработки (90°C) в течение 2–3 ч из полученного субстрата образовалось 25 г/л ВС и 24 г/л глюкозы, ГФГ составила 63% (рис. 1е). При снижении температуры предобработки тростника до 70°C для получения большего выхода сахаров необходимо было увеличить время обработки до 24 ч; в результате концентрация ВС и глюкозы после ферментативного гидролиза субстрата составила 29 и 28 г/л соответственно, ГФГ – 73%.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследования в области синтеза, изучения свойств ГЭР и поиска возможностей их промышленного применения находятся на начальном этапе развития. Привлекательной стороной ГЭР является их принадлежность к “зеленым” растворителям, которые обладают такими преимуществами, как простота синтеза, низкая стоимость (относительно ионных жидкостей), они подвергаются биологическому разложению и нетоксичны [4, 5, 7]. ГЭР могут играть решающую роль в селективной солюбилизации и удалении лигнина из растительной биомассы, сохраняя при этом целлюлозу и гемицеллюлозу интактными и пригодными для их дальнейшей переработки [22].

Считается, что увеличение эффективности ферментативного гидролиза биомассы после ее предварительной обработки ГЭР, в первую очередь, обусловлено делигнификацией и разрушением кристаллической структуры целлюлозы [23]. В работе [24] сравнивались выходы сахаров после ферментативного гидролиза нескольких видов растительного сырья до и после предварительной обработки тремя смесями ХХл/борная кислота, ХХл/глицерин и бетаин/глицерин. Без предобработки эффективность гидролиза уменьшалась в ряду: эвкалиптовая целлюлоза (пульпа) (ГФГ 62%) – МКЦ (49%) – пшеничная солома (18%) – еловые

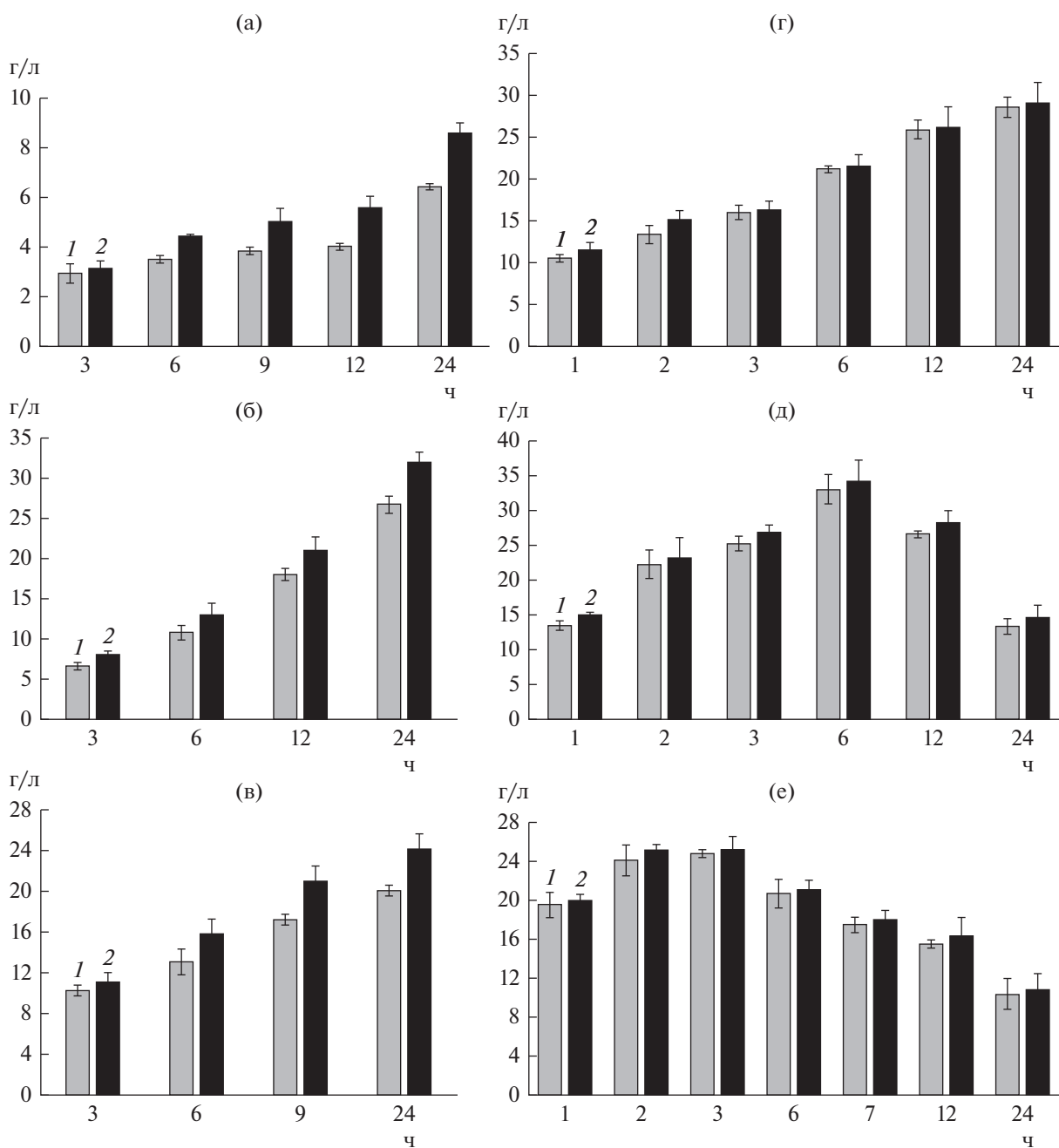


Рис. 1. Концентрация глюкозы (1) и ВС (2) после 48 ч ферментативного гидролиза тростника (40 г/л по сухой массе), предварительно обработанного ХХл/МК при 60 (а), 80 (б) и 90°C (в) или ХХл/ШК при 70 (г), 80 (д) и 90°C (е), после действия ФП В537 (10 мг белка/г субстрата) и F10 (1 мг белка/г субстрата) при 50°C, pH 5.0. На оси абсцисс указано время предобработки.

опилки (8%). Предобработка в ГЭР привела к улучшению выходов ферментативного гидролиза для всех субстратов, при этом тенденция осталась прежней: максимальный выход продуктов гидролиза предобработанной эвкалиптовой целлюлозы (пульпы) составил 100%, 65% – МКЦ, 33% – пшеничной соломы, 20% – еловых опилок. Таким образом, мягкая предварительная обработка ГЭР была эффективна для целлюлозных субстра-

тов (эвкалиптовой целлюлозы, МКЦ), но относительно малоэффективна для пшеничной соломы и еловых опилок.

В данной работе были подобраны условия предобработки тростника ГЭР, в которых ГФГ по выходу ВС увеличивалась от 6% для исходного тростника без предобработки до 80–86% для предобработанного в оптимальных условиях. При

этом основным продуктом гидролиза была глюкоза — она составляла 84 и 97% от всех ВС для смесей ХХл/МК и ХХл/ЩК соответственно, которые использовали в качестве ГЭР.

Большая эффективность кислого ГЭР для предобработки растительной биомассы была отмечена во многих работах [16, 24]. Настоящая работа не является исключением: ГЭР с глицерином или этиленгликолем были менее эффективны, чем ГЭР с органическими кислотами. При этом считается, что чем сильнее кислота, тем больше эффективность ГЭР. Так, при предобработке древесины сосны наибольшие экстракция лигнина и выход продуктов ферментативного гидролиза наблюдались при использовании смеси ХХл с муравьиной кислотой (pK_a 3.75), чем с МК (pK_a 3.86) или с уксусной (pK_a 4.75) при прочих равных условиях [25]. При предобработке пшеничной соломы также предпочтительней была смесь ХХл с ЩК (pK_a 1.2), чем с МК [23]. Предобработка тростника, проведенная в настоящей работе, также подтвердила эту закономерность.

Молярное соотношение донора и акцептора водородной связи также играет важную роль в эффективности предварительной обработки биомассы. Например, при использовании в качестве субстрата смеси целлюлозы и лигнина растворимость последнего улучшалась с увеличением содержания кислоты в смеси ХХл/МК от 1 : 1 до 1 : 9 [26]. Аналогично наблюдалась более высокая солиubilization лигнина из рисовой соломы (от 51 до 60%) при увеличении доли кислоты в соотношении от 1 : 2 до 1 : 5 в смесях ХХл/МК [22]. В другом исследовании увеличение молярного соотношения ХХл/МК с 1 : 2 до 1 : 15 привело к улучшению извлечения лигнина из кукурузных початков с 65 до 93%, но значительного увеличения выхода сахаров при ферментативном гидролизе не произошло (с 79 до 84%), из чего был сделан вывод, что удаление 70% лигнина было достаточным для достижения оптимального выхода продуктов гидролиза [16]. В настоящей работе было показано небольшое увеличение конверсии тростника при увеличении доли кислоты в смеси ХХл/МК (от 1 : 2 до 1 : 5), в то же время увеличение доли кислоты в смеси ХХл/ЩК (от 1 : 1 до 1 : 2), наоборот, приводило к очень существенному уменьшению реакционной способности тростника.

Одним из главных преимуществ использования ГЭР для предобработки растительной биомассы является умеренный нагрев реакционной смеси (до 80–150°C), что минимизировало образование из лигнина токсичных веществ (производных фурфурола, гидроксикислот, алифатических карбоновых кислот) [27]. В таком температурном диапазоне были изучены процессы делигнификации и их влияние на выход ферментативного гидролиза предобработанных в присутствии ГЭР куку-

рузных початков [28]. При использовании смеси ХХл/глицерин с повышением температуры предварительной обработки от 80 до 150°C наблюдалось увеличение ГФГ субстрата от 40 до 92%. При использовании ХХл/мочевина выход продуктов гидролиза также увеличивался, но значительно меньше от 51 до 59% при увеличении температуры предобработки от 80 до 115°C. Однако в диапазоне температур предобработки 80–150°C выход продуктов ферментативного гидролиза кукурузных початков, обработанных в смеси ХХл/имидазол, практически не изменялся и был одинаково высок 92–95%. В аналогичном исследовании [16] сообщалось, что увеличение делигнификации от 18 до 96% наблюдалось при повышении температуры предварительной обработки кукурузных початков смесью ХХл/МК от 70 до 110°C. Однако увеличение выхода продуктов гидролиза (от 45 до 79%) наблюдалось лишь в диапазоне от 70 до 90°C, а затем сохранялось на уровне 78–80%. В настоящей работе изменение температуры и времени предобработки показало, что оптимальной температурой для обработки тростника смесью ХХл/МК является 80°C, причем время предобработки должно быть не менее 24 ч, при этом ГФГ полученного субстрата в растворимые сахара составляло 80%. При использовании смеси ХХл с ЩК (более сильная кислота, чем МК) для получения наибольшего выхода продуктов ферментативного гидролиза надо было либо ограничивать время предварительной обработки при 80°C до 6 ч, либо уменьшать температуру до 70°C, сохраняя время предобработки не менее 24 ч. В первом случае ГФГ полученного субстрата составляла 86%, во втором — 73%.

Таким образом, показана возможность эффективной предобработки тростника с помощью ГЭР на основе ХХл в качестве акцептора водородной связи и МК и ЩК как доноров водородной связи. Оптимизированы условия предобработки тростника: соотношение компонентов ГЭР, температура и время процесса. Это позволило добиться ГФГ предобработанного тростника в результате действия ФП В537 (целлобиогидролаза и эндоглюканаза) и ФП F10 (β -глюкозидаза) 80 и 86% для ГЭР ХХл/МК и ХХл/ЩК соответственно.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гусаков А.В., Сеницын А.П. // Химия биомассы: биотоплива и биопластики. М.: Научный мир. 2017. С. 789. ISBN 978-5-91522-451-2.
2. Conde-Mejiaa C., Jimenez-Gutierrez A., El-Halwagi M. // Process Safety and Environmental Protection. 2012. V. 90. P. 189–202. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2011.08.004>
3. Eggeman T., Elander R.T. // Biores. Technol. 2005. V. 96. P. 2019–2025. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.01.017>

4. *Sattelwal A., Agrawal R., Bhagia S., Das P., Ragauskas A.J.* // *Biofuels Bioprod. Biorefin.* 2017. V. 12. № 1. P. 83–107. <https://doi.org/10.1002/bbb.1818>
5. *Abbott A.P., Boothby D., Capper G., Davies D.L., Rasheed R.K.* // *J. Am. Chem. Soc.* 2004. V. 126. № 29. P. 9142–9147. <https://doi.org/10.1021/ja048266j>
6. *Gorke J.T., Srienc F., Kazlauskas R.J.* // *ACS Symposium Series.* 2010. V. 1038. P. 169–180. <https://doi.org/10.1021/bk-2010-1038.ch014>
7. *Mbous Y.P., Hayyan M., Hayyan A., Wong W.F., Hashim M.A., Looi C.Y.* // *Biotechnol. Adv.* 2017. V. 35. № 2. P. 105–134. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.11.006>
8. *Abbott A.P., Capper G., Davies D.L., Rasheed R.K., Tambyrajah V.* // *Chem. Commun.* 2003. V. 1. P. 70–71. <https://doi.org/10.1039/B210714G>
9. *Martins M.A.R., Pinho S.P., Coutinho J.A.P.* // *J. Solut. Chem.* 2019. V. 48. P. 962–982. <https://doi.org/10.1007/s10953-018-0793-1>
10. *Smith E.L., Abbott A.P., Ryder K.S.* // *Chemical Reviews.* 2014. V. 114. P. 11060–11082. <https://doi.org/10.1021/cr300162p>
11. *Oliveira V.K.D., Gregory C., Francois J.* // *Chem-CatChem.* 2015. V. 7. № 8. P. 1250–1260. <https://doi.org/10.1002/cctc.201500134>
12. *Abo-Hamad A., Hayyan M., Alsaadi M.A., Hashim M.A.* // *Chem. Eng. J.* 2015. V. 273. P. 551–567. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.03.091>
13. *Bhagia S., Li H., Gao X., Kumar R., Wyman C.E.* // *Biotechnol. Biofuels.* 2016. V. 9. № 1. P. 245. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0660-5>
14. *Dumitrache A., Tolbert A., Natzke J., Brown S.D., Davison B.H., Ragauskas A.J.* // *Green Chem.* 2017. V. 19. № 9. P. 2275–2285. <https://doi.org/10.1039/c7gc00346c>
15. *Tang X., Zuo M., Li Z., Liu H., Xiong C., Zeng X. et al.* // *ChemSusChem.* 2017. V. 10. № 13. P. 2696–2706. <https://doi.org/10.1002/cssc.201700457>
16. *Zhang C.-W., Xia S.-Q., Ma P.-S.* // *Biores. Technol.* 2016. V. 219. P. 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.07.026>
17. Количественный химический анализ растительного сырья. / Ред. В.И. Шарков, И.И. Куйбина, Ю.П. Соловьева, Т.А. Павлова. М.: Лесная промышленность, 1976. С. 63–64.
18. *Morozova V.V., Gusakov A.V., Andrianov R.M., Pravitnikov A.G., Osipov D.O., Sinitsyn A.P.* // *Biotechnol. J.* 2010. V. 5. № 8. P. 871–880. <https://doi.org/10.1002/biot.201000050>
19. *Dotsenko G.S., Gusakov A.V., Rozhkova A.M., Korotkova O.G., Sinitsyn A.P.* // *Process Biochem.* 2015. V. 50. P. 1258–1263. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.05.008>
20. *Синицын А.П., Черноглазов В.М., Гусаков А.В.* Итоги науки и техники. М.: ВИНТИ, Биотехнология. 1990. № 25. С. 148.
21. *Sinitsyn A.P., Osipov D.O., Rozhkova A.M., Bushina E.V., Dotsenko G.S., Sinitsyna O.A. et al.* // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2014. V. 50. № 8. P. 761.
22. *Kumar A.K., Parikh B.S., Pravakar M.* // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2016. V. 23. № 10. P. 9265–9275. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4780-4>
23. *Jablonsky M., Škulcova A., Kamenska L., Vrška M., Štíma J.* // *Biores.* 2015. V. 10. № 4. P. 8039–8047. <https://doi.org/10.15376/biores.10.4.8039-8047>
24. *Wahlstrom R., Hiltunen J., Pitaluga De Souza Nascente Sirkka M., Vuoti S., Krus K.* // *RSC Adv.* 2016. V. 6. № 72. P. 68100–68110. <https://doi.org/10.1039/C6RA11719H>
25. *Lynam J.G., Kumar N., Wong M.J.* // *Biores. Technol.* 2017. V. 238. P. 684–689. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.079>
26. *Francisco M., van den Bruinhorst A., Kroon M.C.* // *Green Chem.* 2012. V. 14. № 8. P. 2153–2157. <https://doi.org/10.1039/C2GC35660K>
27. *Tian D., Chandra R.P., Lee J.-S., Lu C., Saddler J.N.* // *Biotechnol. Biofuels.* 2017. V. 10. № 1. P. 157. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0846-5>
28. *Procentese A., Johnson E., Orr V., Garruto Campanile A., Wood J.A., Marzocchella A., et al.* // *Biores. Technol.* 2015. V. 192. P. 31–36. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.05.053>

Cane Pretreatment by Deep Eutetic Solvents to Increase its Reactivity During Enzymatic Hydrolysis with Cellulases

M. V. Semenova^a*, I. S. Vasil'eva^a, A. I. Yaropolov^a, and A. P. Sinitsyn^a

^a Federal Research Center “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: margs@mail.ru

Cane was pretreated with a number of deep eutectic solvents (DES) based on choline chloride (ChCl) as a hydrogen bond acceptor; among hydrogen bond donors, lactic and oxalic acids (LacA and OxA, respectively) were the most effective. Substrate pretreatment conditions (ratio of DES-components, temperature and exposure time) were optimized, leading to the highest yield of reducing sugars (RS) and glucose during subsequent enzymatic hydrolysis with cellulase preparation based on *Penicillium verrucosum*. It was established that in the case of a mixture of ChCl with LacA (the molar ratio of components is 1 : 5) pretreatment should be carried out at 80°C for 24 h, and in the case of a mixture of ChCl with OxA (1 : 1) – at 80°C for 6 hours. The degree of conversion of the pretreated substrate after 48 hours of hydrolysis in the presence of the enzyme preparation (EP) B537 was 80 and 86% by absolutely dry substances for selected mixtures of ChCl/LacA and ChCl/OxA, respectively.

Keywords: cane, “green” chemistry, deep eutectic solvents, saccharification, cellulases, *Penicillium verrucosum*