

**Анализ вещества****Substances analysis**

DOI: 10.26896/1028-6861-2018-84-10-5-11

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕАКЦИОННОЙ СПОСОБНОСТИ  
К ФЕРМЕНТАТИВНОМУ ГИДРОЛИЗУ  
ЦЕЛЛЮЛОЗОСОДЕРЖАЩИХ СУБСТРАТОВ\***© **Екатерина Ивановна Кащеева, Вера Владимировна Будаева**

Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук, г. Бийск, Россия; e-mail: massl@mail.ru

*Статья поступила 30 апреля 2018 г.*

В связи с возрастающим научным интересом к разработке эффективных способов трансформации различных источников целлюлозосодержащего сырья в ферментативные сахара возникла необходимость разработки универсальной методики определения реакционной способности к ферментативному гидролизу целлюлозосодержащих субстратов. Практическая значимость такой методики заключается в максимальной доступности для лабораторий опытно-промышленных производств, занимающихся апробированием и масштабированием биотехнологических процессов. Предложенная в данной работе методика полностью соответствует предъявляемым современным требованиям и основана на спектрофотометрическом и хроматографическом определении редуцирующих веществ в ферментативных гидролизатах предварительно подготовленных субстратов, при этом биокатализ осуществлялся композицией доступных ферментных препаратов «Целлолюкс-А» и «Брюзайм-BGX». Дополнительно данная методика предполагает гравиметрический анализ твердых осадков после гидролиза субстратов. Как правило, для контроля можно ферментировать целлюлозосодержащее сырье без предварительной обработки, но можно использовать и коммерческие виды целлюлозы. Установлено, что применение методики позволило оперативно и с высоким качеством оценить реакционную способность к ферментативному гидролизу ряда выбранных субстратов. В отличие от обсуждаемых в литературе методов ферментативного гидролиза для оценки эффективности ферментов, данная методика позволяет с использованием одной и той же композиции ферментных препаратов расположить в ряд по убыванию реакционной способности к гидролизу выбранные виды целлюлозосодержащего сырья, а также показать зависимость исследуемой способности субстратов от способа предварительной химической обработки. Полученные результаты могут быть представлены в виде зависимости концентрации (выхода) редуцирующих веществ от продолжительности ферментативного гидролиза субстрата, а также в виде рассчитанных значений скорости гидролиза, конечных выходов редуцирующих веществ, в том числе и пентоз, содержания глюкозной составляющей редуцирующих веществ и убыли по массе. Методика была многократно апробирована при анализе широкого круга целлюлозосодержащих субстратов: получены достоверные результаты оценки их реакционной способности. Методика также позволяет прогнозировать результаты масштабирования ферментативного гидролиза, в том числе и в водной среде, при получении питательных сред для микробиологического синтеза.

**Ключевые слова:** целлюлозосодержащий субстрат; методика; реакционная способность; ферментативный гидролиз; редуцирующие вещества; глюкоза; ксилоза; спектрофотометрия; ВЭЖХ.

**DETERMINATION OF THE REACTIVITY OF CELLULOSIC SUBSTRATES  
TOWARDS ENZYMATIC HYDROLYSIS**© **Ekaterina I. Kashcheyeva, Vera V. Budaeva**

Institute for Problems of Chemical and Energetic Technologies, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Biysk, Russia; e-mail: massl@mail.ru

\* Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 17-19-01054).

*Submitted April 30, 2018.*

An ever-growing scientific interest in the development of effective methods for transformation of various cellulosic resources into fermentable sugars necessitates development of a universal procedure for determination of the reactivity of cellulosic substrates towards enzymatic hydrolysis. The practical significance consists in maximum accessibility of the procedure for the labs of pilot-production enterprises engaged in testing and scaling up the biotech processes. The developed procedure fully complies with modern requirements and relies on measuring the concentration of reducing sugars (spectrophotometry and HPLC) in the enzymatic hydrolyzates obtained from pre-prepared substrates, the biocatalysis being run by a cocktail composed of available CelluLuxe-A and BrewZyme-BGX. On top of that, the procedure implies gravimetric analysis of the solid residues after hydrolysis of substrates. Cellulosic biomasses can usually be fermented for control without any pretreatment, however, commercial celluloses can be used as well. The use of the developed procedure is shown to provide prompt and high-quality assessment of the reactivity of a series of chosen substrates to enzymatic hydrolysis. In contrast to the methods of enzymatic hydrolysis discussed in literature for evaluation of the enzyme efficiency, the developed procedure allows arranging of chosen cellulosic raw materials in a descending order of their reactivity to hydrolysis using the same multi-enzyme cocktail and, moreover can demonstrate dependence of the reactivity of substrates on the pretreatment method. The results can be presented as a dependence of the concentration (yield) of reducing sugars on the duration of enzymatic hydrolysis of the substrate, and also in the form of the calculated hydrolysis rates, final yields of reducing sugars including pentoses, content of glucose component of reducing substances and decrease in mass. The procedure was repeatedly tested on a wide range of cellulosic substrates and provided reliable results regarding evaluation of their reactivity and forecasting of the scale-up results of enzymatic hydrolysis, including that in aqueous medium when preparing nutrient broths for microbiological synthesis.

**Keywords:** cellulose-containing substrate; procedure; reactivity; enzymatic hydrolysis; reducing sugars; glucose; xylose; spectrophotometry; HPLC.

Целлюлозосодержащее сырье является наиболее распространенным возобновляемым ресурсом в мире, при этом конверсия биомассы в топливо и химические вещества привлекает интерес исследователей на протяжении десятилетий [1]. Трансформация целлюлозосодержащего сырья в ферментательные сахара является самым большим технологическим препятствием для развития полномасштабного целлюлозно-биоотопливного производства [2]. Для решения этой проблемы в настоящее время проводятся многочисленные исследования, направленные на выбор наиболее эффективного способа предварительной обработки целлюлозосодержащего сырья [3 – 5]. Все способы направлены на увеличение доступности сырья для действия ферментных препаратов: при обработке происходят увеличение площади поверхности и пористости субстратов, уменьшение степени кристалличности целлюлозы и удаление гемицеллюлоз и лигнина [6]. При этом необходимым этапом для масштабирования ферментативного гидролиза от лабораторных исследований до производственных процессов является оценка реакционной способности к ферментативному гидролизу полученных субстратов. Актуальность разработки соответствующей методики обусловлена необходимостью поиска непищевых источников получения питательных сред для биосинтеза бактериальной наноцеллюлозы [7, 8], позволяющих снизить стоимость этого ценного продукта микробиологического синтеза в условиях промышленного производства.

Цель данной работы — разработка универсальной методики оценки реакционной способности к ферментативному гидролизу целлюлозосодержащих субстратов.

В ходе работы использовали следующие реактивы: уксусную кислоту (хч), ацетат натрия (чда, ООО «Неохим», Россия), гидроксид натрия (чда, ООО «Неохим», Россия), 3,5-динитросалициловую кислоту ( $\geq 98\%$ , Acros organics, США), тартрат калия-натрия (хч, ООО «Неохим», Россия), 2,4-динитрофенилгидразин (ч, ЗАО «Вектон», Россия), азид натрия ( $\geq 99,5\%$ , ООО «Неохим», Россия), ацетонитрил (осч, ЗАО «Вектон», Россия), серную кислоту (хч, «Сигма Тек», Россия), соляную кислоту (хч, ООО «ТК АНТ», Россия), орсин ( $\geq 98\%$ , Acros organics, США), дистиллированную и деионизованную воду, ферментные препараты «Целлолюкс-А» (ООО ПО «Сиббиофарм», г. Бердск) и «Брюзайм-BGX» (Polfa Tarchomin Pharmaceutical Works S.A., Польша), а также стандартные образцы сахаров — маннозы, галактозы, глюкозы, арабинозы, ксилозы (Sigma, США).

Воду в субстрате определяли с помощью анализатора влагосодержания Ohaus MB23 (США).

Рентгеноструктурный анализ проводили с использованием дифрактометра ДРОН-3М (Россия).

Ферментативный гидролиз осуществляли на горизонтальной перемешивающей платформе ПЭ-6410М («Экрос», Россия).

Для спектрофотометрического определения концентрации редуцирующих веществ и пентоз использовали спектрофотометр Unico UV-2804 (United products & instruments, США), а для хроматографического определения сахаров в гидролизатах — микроколоночный жидкостной хроматограф «Милюхром А-02» (ЗАО ИХ «ЭкоНова», Новосибирск, Россия) с колонкой размером  $2 \times 75$  мм, заполненной сорбентом ProntoSIL 120-5 C18 AQ (Bishoff, Германия) [9].

Регистрацию хроматограмм и расчет площадей пиков и основных параметров удерживания проводили с помощью персонального компьютера с аналого-цифровым преобразователем и программы «МультиХром».

Для фильтрации гидролизатов использовали вакуумный насос Laborport N811 KT.18 (Франция).

Массы твердых остатков после гидролиза определяли на аналитических электронных весах Ohaus EP214C (Швеция).

Методика определения реакционной способности включает подготовку исследуемого субстрата, его ферментативный гидролиз, отбор проб для определения редуцирующих веществ, фильтрацию полученного гидролизата и его анализ (методами спектрофотометрии и ВЭЖХ), гравиметрический анализ твердых осадков после гидролиза, обработку результатов.

**Подготовка субстрата.** Подготовка анализируемого образца включает определение его основных физико-химических характеристик и, при необходимости (при определении реакционной способности нативного сырья для контроля), измельчение субстрата до размера частиц не более 5 мм любым доступным способом. Воду в субстрате определяют с помощью анализатора влагосодержания, состав и характеристики субстрата — общепринятыми регламентируемыми ГОСТ и специальными методами анализа растительного сырья. В нативном сырье и полупродуктах определяют целлюлозу по Кюршнеру обработкой спиртоазотной смесью [10], в образцах целлюлозы —  $\alpha$ -целлюлозу обработкой 17,5 %-ным раствором гидроксида натрия [11]. Кислотонерастворимый лигнин в субстратах определяют методом Комарова [10], пентозаны — железоорсиновым методом [12], золу — методом сжигания [13]. Степень полимеризации целлюлозы определяют измерением времени истечения растворенных в кадоксене образцов целлюлозы с помощью капиллярного вискозиметра ВПЖ-3 (Россия) [14]. Степень кристалличности целлюлозы рассчитывают по методу Руланда из интегральных интенсивностей отражений и диффузного фона аморфной составляющей рентгенограмм [15].

**Ферментативный гидролиз.** Для гидролиза исследуемого образца используется высокоэффективная композиция промышленных ферментных препаратов «Целлолюкс-А» и «Брюзайм ВГХ» (1:1), представляющая собой комплекс целлюлазных, ксиланазных и  $\beta$ -глюканазных ферментов. Навеску субстрата массой 4,5 г в пересчете на абсолютно сухое вещество помещают в коническую колбу объемом 500 см<sup>3</sup> и добавляют 150 см<sup>3</sup> ацетатного буферного раствора с растворенными в нем ферментными препаратами. Фермент-субстратное соотношение составляет 1:50. Колбу с суспензией помещают на перемешивающую платформу с частотой колебаний 150 мин<sup>-1</sup>. Гидролиз проводят при оптимальных параметрах процесса, позволяющих получить максимальный выход редуцирующих веществ: температура —  $45 \pm 2$  °С, pH —  $4,6 \pm 0,3$ , концентрация субстрата — 30 г/л. Продолжительность процесса составляет 72 ч.

Через каждые 8 ч отбирают пробы гидролизатов объемом 5 см<sup>3</sup> для определения редуцирующих веществ (РВ) и оценки скорости и степени гидролиза субстрата. Для одного субстрата проводят два параллельных определения.

По окончании гидролиза суспензию фильтруют под вакуумом, остаток на фильтре высушивают и взвешивают. В фильтрате определяют редуцирующие вещества (в пересчете на глюкозу) и пентозы (в пересчете на ксилозу) спектрофотометрическим методом, фильтрат также анализируют методом ВЭЖХ.

**Анализ гидролизата.** Спектрофотометрическое определение редуцирующих веществ (в пересчете на глюкозу) [16, 17] основано на восстановлении редуцирующим сахаром 3,5-динитросалициловой кислоты (желтый цвет) до 3-амино-5-нитросалициловой (желто-оранжевый цвет,  $\lambda = 530$  нм). Достоинствами данного метода являются простота выполнения и высокая точность. Относительная погрешность составляет  $\pm 3,5$  %.

Пентозы (в пересчете на ксилозу) определяют по реакции фурфурола, образующегося при нагревании гидролизата в растворе соляной кислоты, с орсином ( $\lambda = 630$  нм) [12]. Относительная погрешность метода —  $\pm 5$  %.

Определение сахаров в гидролизате методом ВЭЖХ включает дериватизацию слабопоглощающих в УФ области спектра сахаров гидролизата в 2,4-динитрофенилгидразоны, поглощающие свет на длине волны 360 нм, с последующим разделением и определением [18]. Главными достоинствами метода являются отсутствие сложной пробоподготовки и высокая точность.

Осадки после фильтрования гидролизата высушивают в сушильном шкафу и взвешивают, по массе осадка рассчитывают убыль по массе.

**Обработка результатов.** Полученные результаты могут быть представлены в виде зависимости концентрации (выхода) редуцирующих веществ от продолжительности ферментативного гидролиза субстрата, а также в виде рассчитанных значений скорости гидролиза, конечных выходов редуцирующих веществ, в том числе и пентоз, содержания глюкозной составляющей редуцирующих веществ и убыли по массе.

Выход редуцирующих веществ можно считать от массы субстрата (формула 1) или от массы гидролизуемых компонентов, т.е. за вычетом нецеллюлозных примесей золы и лигнина (формула 2):

$$\eta_{PB} = (C_K V_r) / m_c \cdot 0,9 \cdot 100, \quad (1)$$

$$\eta_{PBГ} = (C_K V_r) / [m_c (100 - Л - З)] \cdot 0,9 \cdot 100 \cdot 100, \quad (2)$$

где  $\eta_{PB}$ ,  $\eta_{PBГ}$  — выход редуцирующих веществ от массы субстрата и гидролизуемых компонентов соответственно, %;  $C_K$  — конечная концентрация редуцирующих веществ в гидролизате, г/л;  $V_r$  — объем ацетатного буферного раствора, л; 0,90 — коэффициент, обусловленный присоединением молекулы воды к ангидроглюкозным остаткам соответствующих мономерных звеньев в результате ферментативного гидролиза;  $m_c$  — масса субстрата для ферментации, г; Л, З — массовые доли лигнина и золы в субстрате соответственно, %.

Допускается представлять результат ферментативного гидролиза в виде конечной концентрации (выхода) редуцирующих веществ через 72 ч.

Выход пентоз (%) рассчитывают от массы пентозанов в субстрате по формуле:

$$\eta_{\Pi} = \frac{C_{\Pi} V_r}{m_c \Pi} \cdot 0,88 \cdot 100 \cdot 100, \quad (3)$$

где  $C_{\Pi}$  — концентрация пентоз в гидролизате, г/л;  $V_r$  — объем ацетатного буферного раствора, л; 0,88 — коэффициент, обусловленный присоединением молекулы воды к ангидаксилонным остаткам соответствующих мономерных звеньев в результате ферментативного гидролиза;  $m_c$  — масса субстрата для ферментативного гидролиза, г;  $\Pi$  — массовая доля пентозанов в субстрате, %.

Убыль по массе (%) рассчитывают по формуле:

$$Y = m_{oc} / m_{нав} \cdot 100, \quad (4)$$

где  $m_{oc}$  — масса осадка после фильтрования гидролизата и высушивания, г;  $m_{нав}$  — масса навески субстрата для ферментативного гидролиза, г.

В процессе разработки методики многократно использовали для оценки реакционной способности к ферментативному гидролизу широкого круга целлюлозосодержащих субстратов, в том числе, мискантуса, плодовых оболочек овса и продуктов их предварительной обработки [19–24], а также брикетированной рапсовой соломы [25], волокна льна-долгунца, продуктов химической обработки соломы ржи [26], образцов целлюлозы, полученных из хлопка и древесины, и других субстратов.

Несмотря на значительное число публикаций [1, 4–6, 27] с рекомендациями по обоснованию источников целлюлозосодержащего сырья или выбору способов предварительной обработки этих видов сырья для эффективного ферментативного гидролиза, отсутствуют универсальные методики определения реакционной способности субстратов к ферментативному гидролизу, с которыми можно было бы сравнить данную методику. Многократное использование этой методики для анализа субстратов, предоставленных различными научными и образовательными учреждениями (Белорусский государственный университет, г. Минск; ИХ Коми УрО РАН, г. Сыктывкар; ИХиХТ СО РАН, г. Красноярск), показало, что с ее помощью можно достоверно оценить реакционную способность субстратов, а также прогнозировать результаты масштабирования ферментативного гидролиза.

В частности, по разработанной методике определяли реакционную способность к ферментативному гидролизу нативного мискантуса (контроль) и продуктов его химической обработки. Мискантус (субстрат 1) измельчали до размера частиц 5 мм. Другие субстраты были получены на опытно-промышленном производстве ИПХЭТ СО РАН путем химической обработки, включающей следующие стадии: предварительный гидролиз измельченного мискантуса 0,5–1,0 %-ным раствором азотной кислоты с получением целлюлозосодержащего продукта (субстрат 2), азотнокислая варка целлюлозосодержащего продукта в 4 %-ном растворе азотной кислоты с получением лигноцеллюлозного материала (субстрат 3), обработка лигноцеллюлозного материала 2 %-ным раствором гидроксида натрия с получением технической целлюлозы (субстрат 4). В соответствии с методикой были определены основные физико-химические характеристики субстратов, которые представлены в табл. 1.

Химическая обработка мискантуса приводит к следующим изменениям (субстрат 1 — субстрат 4 соответственно): увеличению массовой доли целлюлозы с 57,4 до 89,6 %, снижению массовой доли легкогидролизуемых пентозанов с 23,3 до 1,3 %, уменьшению массовой доли оста-

**Таблица 1.** Характеристики мискантуса и продуктов его химической обработки

| Субстрат | Массовая доля, %  |         |            |      | Характеристики целлюлозы |                            |
|----------|-------------------|---------|------------|------|--------------------------|----------------------------|
|          | целлюлозы         | лигнина | пентозанов | зола | Степень полимеризации    | Степень кристалличности, % |
| 1        | 57,4 <sup>1</sup> | 19,1    | 23,3       | 3,9  | —                        | 46                         |
| 2        | 62,8 <sup>1</sup> | 20,9    | 9,6        | 2,0  | —                        | ~46                        |
| 3        | 79,9 <sup>2</sup> | 8,8     | 4,7        | 3,7  | —                        | 66                         |
| 4        | 89,6 <sup>2</sup> | 2,6     | 1,3        | 7,0  | 1005                     | 65                         |

<sup>1</sup> Массовая доля целлюлозы по Кюршнеру.<sup>2</sup> Массовая доля α-целлюлозы.

точного лигнина с 19,1 до 2,6 %. Зольность уменьшается с 3,9 % в мискантусе до 2,0 % в целлюлозосодержащем продукте, а затем возрастает до 7,0 % в целлюлозе. Значение степени полимеризации для образца технической целлюлозы достаточно высокое (1005), откуда следует, что описанная выше химическая обработка лигноцеллюлозного материала не оказывает сильного деструктирующего воздействия на целлюлозу сырья. Значения степени кристалличности целлюлозы в образцах лигноцеллюлозного материала и технической целлюлозы довольно высокие (65 – 66 %) [28], что по общим представлениям не предполагает высокую реакционную способность субстратов к гидролизу [29]. Результаты оценки реакционной способности к ферментативному гидролизу субстратов через 72 ч представлены в табл. 2.

По результатам эксперимента видно, как изменяется реакционная способность субстратов при химической обработке. Конечная концентрация редуцирующих веществ в гидролизатах увеличивается в ряду мискантус — техническая целлюлоза в 7,6 раза (от 4,1 до 31,0 г/л). Наибольшей реакционной способностью характеризуются образцы лигноцеллюлозного материала и технической целлюлозы со значениями выхода редуцирующих веществ через 72 ч гидролиза 80 и 84 % соответственно. Несмотря на высокие значения степени кристалличности, оба субстрата гидролизуются с выходом редуцирующих веществ от массы гидролизуемых компонентов 91,9 – 92,5 %, близким к количественному. При этом вклад пентоз в общую концентрацию редуцирующих веществ незначителен — 1,3 – 3,4 %. Полученные результаты позволяют расположить субстраты в ряд в порядке убывания реакционной способности к гидролизу: субстрат 4 ≥ субстрат 3 > субстрат 2 > субстрат 1. Поэтому лигноцеллюлозный материал или техническую целлюлозу можно рекомендовать в качестве перспективных субстратов при последующем масштабировании ферментативного гидролиза в водной среде и получении питательных сред для микробиологиче-

**Таблица 2.** Результаты оценки реакционной способности к ферментативному гидролизу мискантуса и продуктов его предварительной обработки через 72 ч

| Суб-страт | Конечная концентрация, г/л |        | Выход редуцирующих веществ, % |                                    |
|-----------|----------------------------|--------|-------------------------------|------------------------------------|
|           | редуцирующих веществ       | пентоз | от массы субстрата            | от массы гидролизуемых компонентов |
| 1         | 4,1                        | 0,06   | 11,1                          | 13,7                               |
| 2         | 6,8                        | 0,6    | 18,4                          | 23,9                               |
| 3         | 29,8                       | 1,0    | 80,4                          | 91,9                               |
| 4         | 31,0                       | 0,4    | 83,6                          | 92,5                               |

ского синтеза. Следует отметить, что низкая концентрация пентоз 0,4 г/л при общей концентрации редуцирующих веществ 31,0 г/л в гидролизате технической целлюлозы определяет данный гидролизат как преимущественно глюкозосодержащий, следовательно, предложенный вариант химической обработки сырья в процессе получения технической целлюлозы из мискантуса можно характеризовать как наиболее эффективный и привлекательный способ получения субстратов для последующего микробиологического синтеза.

Таким образом, разработана универсальная методика оценки реакционной способности к ферментативному гидролизу целлюлозосодержащих субстратов. Методика включает подготовку исследуемого субстрата, его ферментативный гидролиз композицией доступных ферментных препаратов «Целлолюкс-А» и «Брюзайм-BGX» при оптимальных условиях (начальная концентрация субстрата, температура, pH среды, продолжительность гидролиза, соотношение ферментов композиции), обеспечивающих максимальный выход редуцирующих веществ, отбор проб для определения редуцирующих веществ, фильтрование полученного гидролизата и его анализ (методами спектрофотометрии и ВЭЖХ), обработку результатов. Дополнительно данная методика предполагает гравиметрический анализ твердых осадков после гидролиза субстратов.

В целях контроля можно ферментировать целлюлозосодержащее сырье без предварительной обработки, но можно использовать и коммерческие виды целлюлозы. В отличие от обсуждаемых в литературе методов ферментативного гидролиза для оценки эффективности ферментов, данная методика позволяет с использованием одной и той же композиции ферментов расположить в ряд по убыванию реакционной способности к гидролизу выбранные виды целлюлозосодержащего сырья, а также показать зависимость исследуемой способности субстратов от способа предварительной химической обработки. Полученные результаты могут быть представлены в виде зависимости концентрации (выхода) редуцирующих веществ от продолжительности ферментативного гидролиза субстрата, а также в виде рассчитанных значений скорости гидролиза, конечных выходов редуцирующих веществ, в том числе и пентоз, содержание глюкозной составляющей редуцирующих веществ и убыли по массе.

Практическая значимость методики заключается в ее доступности для лабораторий не только научных и образовательных учреждений, но и опытно-промышленных производств, занимающихся апробированием и масштабированием биотехнологических процессов. Применение методики для анализа широкого круга целлюлозосодержащих субстратов позволило достоверно оценить их реакционную способность, а также прогнозировать результаты масштабирования ферментативного гидролиза при получении питательных сред для микробиологического синтеза.

*Работа выполнена с использованием оборудования Бийского регионального центра коллективного пользования СО РАН (ИПХЭТ СО РАН, г. Бийск).*

## ЛИТЕРАТУРА

1. **Chen B., Zhao B., Li M., et al.** Fractionation of rapeseed straw by hydrothermal/dilute acid pretreatment combined with alkali post-treatment for improving its enzymatic hydrolysis / *Biores. Technol.* 2017. Vol. 225. P. 127 – 133.
2. **Sills D. L., Gossett J. M.** Using FTIR to predict saccharification from enzymatic hydrolysis of alkali-pretreated biomasses / *Biotechnol. Bioeng.* 2012. Vol. 109. N 2. P. 353 – 362.
3. **Alvira P., Tomás-Pejó E., Ballesteros M., et al.** Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review / *Biores. Technol.* 2010. Vol. 101. N 13. P. 4851 – 4861.
4. **Li K., Wan J., Wang X., et al.** Comparison of dilute acid and alkali pretreatments in production of fermentable sugars from bamboo: Effect of Tween 80 / *Industrial Crops and Products.* 2016. Vol. 83. P. 414 – 422.
5. **Sun S., Sun S., Cao X., et al.** The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials / *Biores. Technol.* 2016. Vol. 199. P. 49 – 58.
6. **Van Dyk J. S., Pletschke B. I.** A review of lignocellulose bio-conversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes — factors affecting enzymes, conversion and synergy / *Biotechnol. Adv.* 2012. Vol. 30. N 6. P. 1458 – 1480.
7. **Gama M.** Bacterial NanoCellulose from Biotechnology to Bio-Economy. — N.Y.: Elsevier, 2016. — 240 p.
8. **Sakovich G. V., Skiba E. A., Budaeva V. V., et al.** Technological fundamentals of bacterial nanocellulose production from zero prime-cost feedstock / *Doklady Biochemistry and Biophysics.* 2017. Vol. 477. P. 357 – 359.
9. **Барам Г. И.** Развитие метода микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии и его применение для решения комплексных аналитических задач: дис. ... докт. хим. наук. — Иркутск, 1997. — 56 с.
10. **Оболенская А. В., Ельницкая З. П., Леонович А. А.** Лабораторные работы по химии древесины и целлюлозы. — М.: Экология, 1991. — 320 с.
11. ГОСТ 6840–78. Целлюлоза. Метод определения содержания альфа-целлюлозы. — М.: Изд-во стандартов, 1984. — 6 с.
12. ГОСТ 10820–75. Целлюлоза. Метод определения массовой доли пентозанов. — М.: ИПК Изд-во стандартов, 1975. — 7 с.
13. ГОСТ 18461–93. Целлюлоза. Метод определения содержания золы. — М.: ИПК Изд-во стандартов, 1995. — 8 с.
14. ГОСТ 25438–82. Целлюлоза для химической переработки. Методы определения характеристической вязкости. — М.: Изд-во стандартов, 1982. — 20 с.
15. **Thygesen A., Oddershede J., Lilholt H., et al.** On the determination of crystallinity and cellulose content in plant fibres / *Cellulose.* 2005. Vol. 12. N 6. P. 563 – 576.
16. **Gusakov A. V., Kondratyeva E. G., Sinitsyn A. P.** Comparison of two methods for assaying reducing sugars in the determination of carbohydrase activities / *Int. J. Anal. Chem.* 2011. Vol. 2011. P. 283658.
17. **Вешняков В. А., Хабаров Ю. Г., Камакина Н. Д.** Сравнение методов определения редуцирующих веществ: метод Бертрана, эбулиостатический и фотометрический / *Химия растительного сырья.* 2008. № 4. С. 47 – 50.
18. **Федорова Г. А., Кожанова Л. А., Азарова И. Н.** Применение микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии в медицине. Часть 2 / *Вестник восстановительной медицины.* 2008. № 2(24). С. 47 – 50.
19. **Budaeva V. V., Makarova E. I., Skiba E. A., et al.** Enzymatic hydrolysis of the products of hydro-thermobaric processing of Miscanthus and oat hulls / *Catalysis in Industry.* 2013. Vol. 5. N 4. P. 335 – 341.
20. **Makarova E. I., Budaeva V. V., Skiba E. A., et al.** Enzymatic hydrolysis of celluloses obtained via the hydrothermal processing of Miscanthus and oat hulls / *Catalysis in Industry.* 2014. Vol. 6. N 1. P. 67 – 71.
21. **Denisova M. N., Makarova E. I., Pavlov I. N., et al.** Enzymatic hydrolysis of hydrotropic pulp at different substrate concentrations / *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2016. Vol. 178. N 6. P. 1196 – 1206.
22. **Tarabanko V. E., Kaygorodov K. L., Skiba E. A., et al.** Processing pine wood into vanillin and glucose by sequential catalytic oxidation and enzymatic hydrolysis / *J. Wood Chem. Technol.* 2017. Vol. 37. N 1. P. 43 – 51.
23. **Skiba E. A., Baibakova O. V., Budaeva V. V., et al.** Pilot technology of ethanol production from oat hulls for subsequent conversion to ethylene / *Chem. Eng. J.* 2017. Vol. 329. P. 178 – 186.
24. **Makarova E. I., Budaeva V. V., Kukhlenko A. A., et al.** Enzyme kinetics of cellulose hydrolysis of miscanthus and oat hulls / *3 Biotech.* 2017. Vol. 7. P. 317.
25. **Будаева В. В., Макарова Е. И., Скиба Е. А. и др.** Исследование кислотного и ферментативного гидролиза пеллет из рапсовой соломы / *Ползуновский вестник.* 2013. № 3. С. 173 – 179.
26. **Щербакова Т. П., Удоратина Е. В., Макарова Е. И. и др.** Влияние механохимических воздействий на эффективность ферментативного гидролиза лигноцеллюлозного сырья / *Ползуновский вестник.* 2013. № 3. С. 224 – 230.
27. **De Bhowmick G., Sarmah A. K., Sen R.** Lignocellulosic biorefinery as a model for sustainable development of biofuels

- and value added products / *Biores. Technol.* 2018. Vol. 247. P. 1144 – 1154.
28. **Алешина Л. А., Люханова И. В., Будаева В. В. и др.** Результаты рентгеноструктурного анализа недревесных целлюлоз / *Ученые записки Петрозаводского гос. ун-та.* 2011. № 8(121). С. 114 – 117.
  29. **Hu F., Ragauskas A.** Pretreatment and Lignocellulosic Chemistry / *BioEnergy Res.* 2012. Vol. 5. N 4. P. 1043 – 1066.
- ## REFERENCES
1. **Chen B., Zhao B., Li M., et al.** Fractionation of rapeseed straw by hydrothermal/dilute acid pretreatment combined with alkali post-treatment for improving its enzymatic hydrolysis / *Biores. Technol.* 2017. Vol. 225. P. 127 – 133.
  2. **Sills D. L., Gossett J. M.** Using FTIR to predict saccharification from enzymatic hydrolysis of alkali-pretreated biomasses / *Biotechnol. Bioeng.* 2012. Vol. 109. N 2. P. 353 – 362.
  3. **Alvira P., Tomás-Pejó E., Ballesteros M., et al.** Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review / *Biores. Technol.* 2010. Vol. 101. N 13. P. 4851 – 4861.
  4. **Li K., Wan J., Wang X., et al.** Comparison of dilute acid and alkali pretreatments in production of fermentable sugars from bamboo: Effect of Tween 80 / *Industrial Crops and Products.* 2016. Vol. 83. P. 414 – 422.
  5. **Sun S., Sun S., Cao X., et al.** The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials / *Biores. Technol.* 2016. Vol. 199. P. 49 – 58.
  6. **Van Dyk J. S., Pletschke B. I.** A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes — factors affecting enzymes, conversion and synergy / *Biotechnol. Adv.* 2012. Vol. 30. N 6. P. 1458 – 1480.
  7. **Gama M.** Bacterial NanoCellulose from Biotechnology to Bio-Economy. — N.Y.: Elsevier, 2016. — 240 p.
  8. **Sakovich G. V., Skiba E. A., Budaeva V. V., et al.** Technological fundamentals of bacterial nanocellulose production from zero prime-cost feedstock / *Doklady Biochemistry and Biophysics.* 2017. Vol. 477. P. 357 – 359.
  9. **Baram G. I.** Progress in microcolumn high-performance liquid chromatography and its application to solve complex analytical problems. Doctoral thesis. — Irkutsk, 1997. — 56 p. [in Russian].
  10. **Obolenskaya A. V., Elnitskaya Z. P., Leonovich A. A.** Laboratory Works on Wood and Cellulose Chemistry. — Moscow: Ékologiya, 1991. — 320 p. [in Russian].
  11. State standard GOST 6840–78. Cellulose. Method for determination of alpha-cellulose. — Moscow: Izd. standartov, 1984. — 6 p. [in Russian].
  12. State standard GOST 10820–75. Cellulose. Method for determination of pentosans. — Moscow: Izd. standartov, 1975. — 7 p. [in Russian].
  13. Interstate standard GOST 18461–93. Cellulose. Method for quantification of ash. — Moscow: IPK Izd. standartov, 1995. — 8 p. [in Russian].
  14. State standard GOST 25438–82. Dissolving cellulose. Methods for determination of intrinsic viscosity. — Moscow: Izd. standartov, 1982. — 20 p. [in Russian].
  15. **Thygesen A., Oddershede J., Lilholt H., et al.** On the determination of crystallinity and cellulose content in plant fibres / *Cellulose.* 2005. Vol. 12. N 6. P. 563 – 576.
  16. **Gusakov A. V., Kondratyeva E. G., Sinitsyn A. P.** Comparison of two methods for assaying reducing sugars in the determination of carbohydrase activities / *Int. J. Anal. Chem.* 2011. Vol. 2011. P. 283658.
  17. **Veshnyakov V. A., Habarov Yu. G., Kamakina N. D.** Comparison of reducing compounds determination methods: Bertrand's method, ebulliostatical and photometrical methods / *Khim. Rastit. Syr'ya.* 2008. N 4. P. 47 – 50 [in Russian].
  18. **Fedorova G. A., Kozhanova L. A., Azarova I. N.** Application of microcolumn high-performance liquid chromatography in medicine. Part II / *Vestn. Vosstanovit. Med.* 2008. N 2(24). P. 47 – 50 [in Russian].
  19. **Budaeva V. V., Makarova E. I., Skiba E. A., et al.** Enzymatic hydrolysis of the products of hydro-thermobaric processing of Miscanthus and oat hulls / *Catalysis in Industry.* 2013. Vol. 5. N 4. P. 335 – 341.
  20. **Makarova E. I., Budaeva V. V., Skiba E. A., et al.** Enzymatic hydrolysis of celluloses obtained via the hydrothermal processing of Miscanthus and oat hulls / *Catalysis in Industry.* 2014. Vol. 6. N 1. P. 67 – 71.
  21. **Denisova M. N., Makarova E. I., Pavlov I. N., et al.** Enzymatic hydrolysis of hydrotropic pulp at different substrate concentrations / *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2016. Vol. 178. N 6. P. 1196 – 1206.
  22. **Tarabanko V. E., Kaygorodov K. L., Skiba E. A., et al.** Processing pine wood into vanillin and glucose by sequential catalytic oxidation and enzymatic hydrolysis / *J. Wood Chem. Technol.* 2017. Vol. 37. N 1. P. 43 – 51.
  23. **Skiba E. A., Baibakova O. V., Budaeva V. V., et al.** Pilot technology of ethanol production from oat hulls for subsequent conversion to ethylene / *Chem. Eng. J.* 2017. Vol. 329. P. 178 – 186.
  24. **Makarova E. I., Budaeva V. V., Kukhlenko A. A., et al.** Enzyme kinetics of cellulose hydrolysis of miscanthus and oat hulls / *3 Biotech.* 2017. Vol. 7. P. 317.
  25. **Budaeva V. V., Makarova E. I., Skiba E. A., et al.** A study of acid and enzymatic hydrolyses of rape straw pellets / *Polzunov. Vestn.* 2013. N 3. P. 173 – 179 [in Russian].
  26. **Shcherbakova T. P., Udoratina E. V., Makarova E. I., et al.** The effect of mechano-chemical stimuli on the enzymatic hydrolysis efficiency of lignocellulosic feedstocks / *Polzunov. Vestn.* 2013. N 3. P. 224 – 230 [in Russian].
  27. **De Bhowmick G., Sarmah A. K., Sen R.** Lignocellulosic biorefinery as a model for sustainable development of biofuels and value added products / *Biores. Technol.* 2018. Vol. 247. P. 1144 – 1154.
  28. **Aleshina L. A., Lyuhanova I. V., Budaeva V. V., et al.** X-ray diffraction analysis results for non-woody celluloses / *Uch. Zap. Petrozavod. Gos. Univ.* 2011. N 8(121). P. 114 – 117 [in Russian].
  29. **Hu F., Ragauskas A.** Pretreatment and Lignocellulosic Chemistry / *BioEnergy Res.* 2012. Vol. 5. N 4. P. 1043 – 1066.