

## ТЕХНОЛОГИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ TECHNOLOGY OF ORGANIC SUBSTANCES

Научная статья

УДК 663.534

DOI: 10.26730/1999-4125-2022-1-44-55

### ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ МЕТОДОВ ПРЕДОБРАБОТКИ МИКРОКРИСТАЛЛИЧЕСКОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ И УСЛОВИЙ ЕЕ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА НА ВЫХОД РЕДУЦИРУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ

Масютин Яков Андреевич<sup>1</sup>, Ван Елена Юрьевна<sup>1</sup>,  
Смага Мария Артуровна<sup>1</sup>, Басова Юлия Сергеевна<sup>1</sup>,  
Михайлов Владимир Геннадьевич<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Балтийский федеральный университет имени И. Канта

<sup>2</sup>Кузбасский государственный технический университет имени Т.Ф. Горбачева

\*для корреспонденции: [uma1989@mail.ru](mailto:uma1989@mail.ru)



#### Информация о статье

Поступила:

30 декабря 2021 г.

Одобрена после

рецензирования:

30 января 2022 г.

Принята к публикации:

25 февраля 2022 г.

#### Ключевые слова:

микрористаллическая  
целлюлоза, глюкоза,  
редуцирующие вещества,  
ферментативный гидролиз,  
ферментный препарат,  
биоэтанол, химическая  
технология топлив,  
биотехнология

#### Аннотация.

В настоящее время ведется активный поиск альтернативных доступных, возобновляемых и экологически чистых источников энергии в связи с комплексом факторов, усложняющих добычу и переработку традиционных ископаемых ресурсов, и их негативным влиянием на окружающую среду. Лигноцеллюлозное, растительное сырье является самым распространенным возобновляемым полимером на Земле и его запасы практически неисчерпаемы. Целлюлоза, получаемая из него, служит удобным модельным субстратом для отработки способов ее конверсии в продукты топливного назначения. Целью настоящей работы являлось исследование влияния выбора ферментного препарата и методов предобработки микрористаллической целлюлозы на выход редуцирующих веществ. Методами исследования в работе являлись весовой анализ для оценки выхода целлюлозы и содержания лигнина; фотометрический метод определения  $\alpha$ -целлюлозы; SEM для оценки результатов химической предобработки целлюлозы; фотометрический метод определения РВ. В результате было исследовано влияние методов предварительной обработки микрористаллической целлюлозы различными реагентами ( $ZnCl_2$ ,  $NaOH$ ,  $H_3PO_4$ ) на выход редуцирующих веществ. Подобраны оптимальные условия ферментативного гидролиза для препарата «Целлюлаза». Экспериментально установлено оптимальное соотношение ферментных препаратов «Целлюлаза» и «Ксиланаза» с целью максимизации выхода РВ и проведен гидролиз всех исследуемых образцов данной смесью препаратов в установленном соотношении. Содержание редуцирующих веществ в пересчете на глюкозу в гидролизатах определено фотометрическим методом по реакции с медно-щелочным реактивом. Также предложена принципиальная технологическая схема по переработке целлюлозосодержащего сырья в продукты с высокой добавленной стоимостью топливного назначения.

*Для цитирования:* Масютин Я.А., Ван Е.Ю., Смага М.А., Басова Ю.С., Михайлов В.Г. Исследование влияния методов предобработки микрокристаллической целлюлозы и условий ее ферментативного гидролиза на выход редуцирующих веществ // Вестник Кузбасского государственного технического университета. 2022. № 1 (149). С. 44-55. doi: 10.26730/1999-4125-2022-1-44-55

Целью настоящей работы являлось исследование влияния выбора ферментного препарата и методов обработки микрокристаллической целлюлозы (МКЦ) на выход редуцирующих веществ.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- обработка образцов МКЦ тремя различными реагентами (хлорид цинка, гидроксид натрия, фосфорная кислота) с целью увеличения ее реакционной способности;
- исследование основных физико-химических свойств полученных образцов целлюлозы по ГОСТ 595-79;
- подбор оптимальных параметров ферментативного гидролиза целлюлозы для ферментных индивидуальных препаратов «Целлюлаза» и «Ксиланаза»;
- подбор соотношения ферментных препаратов «Целлюлаза» и «Ксиланаза» с целью увеличения выделения редуцирующих веществ в процессе ферментативного гидролиза;
- проведение ферментативного гидролиза полученных образцов целлюлозы в оптимальных условиях с мониторингом выделения редуцирующих веществ.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Получение и обработка целлюлозы

Первая стадия эксперимента включала в себя несколько этапов:

- 1) проведение обработки образцов МКЦ с целью увеличения ее реакционной способности;
- 2) проверка качества полученного материала в соответствии по ГОСТ 595-79;
- 3) изучение структуры полученных образцов методом SEM.

Далее проводилась обработка образцов микрокристаллической целлюлозы (образца Ц1) согласно методикам [5-7].

Образец Ц2 получали методом обработки МКЦ раствором хлорида цинка по методике [5]. Образец Ц3 получали согласно методике [6] обработкой МКЦ раствором гидроксида натрия. Образец Ц4 получали согласно методике [7] обработкой МКЦ ортофосфорной кислотой.

Выход полученных образцов целлюлозы относительно исходного образца МКЦ (% масс.) рассчитывали по формуле (1):

$$\% \text{ мас.} = \frac{m_1}{m_2} \cdot 100, (1)$$

где % мас. – выход полученной целлюлозы относительно сухой образца МКЦ, %;

$m_1$  – масса сухого образца МКЦ, г;

$m_2$  – масса целлюлозы, полученной в ходе процесса делигнификации, г.

Результаты определения выхода полученных целлюлоз относительно сухой биомассы представлены в Таблице 1.

Полученные образцы целлюлоз проверяли на соответствие ГОСТ 595-79. Целевыми показателями качества полученных образцов были выбраны массовая доля остатка, нерастворимого в серной кислоте (лигнина) и массовая доля  $\alpha$ -целлюлозы. Методики определения целевых показателей проводили согласно ГОСТ 595-79. Результаты определений представлены в Таблице 2.

Показатели для образца Ц1 были взяты согласно техническим характеристикам целлюлозы микрокристаллической (М 102) Авицель.

После оценки основных показателей качества образцы подготавливались для проведения сканирующей электронной микроскопии (SEM) для оценки структуры до и после химической обработки. Для проведения SEM было необходимо обезвоживать образцы. Для этого полученные образцы выдерживали в формалине и растворах этанола (70, 80, 90, 96 %-ные растворы), затем в ксилоле. Обезвоженные образцы передавали в лабораторию НТП «Фабрика» БФУ им. И. Канта, где они были исследованы методом электронной микроскопии на двухлучевой станции Zeiss

Таблица 1. Выход полученной целлюлозы относительно сухой биомассы

Table 1. Yield of obtained pulp relative to dry biomass

Целлюлоза	Выход, %
Ц2	59,90 ± 2,99
Ц3	55,30 ± 2,77
Ц4	51,00 ± 2,55

Таблица 2. Целевые показатели исходного и полученных образцов целлюлозы

Table 2. Target values of the initial and obtained samples of pulp

Образцы целлюлозы	Показатели		
	Массовая доля лигнина, %	Массовая доля α-целлюлозы, %	Влажность, %
Ц1	< 0,1	95-97	3,0-5,0
Ц2	< 0,1	95,7 ± 4,8	10,10 ± 0,51
Ц3	< 0,1	95,4 ± 4,8	8,90 ± 0,45
Ц4	< 0,1	96,8 ± 4,8	9,70 ± 0,49

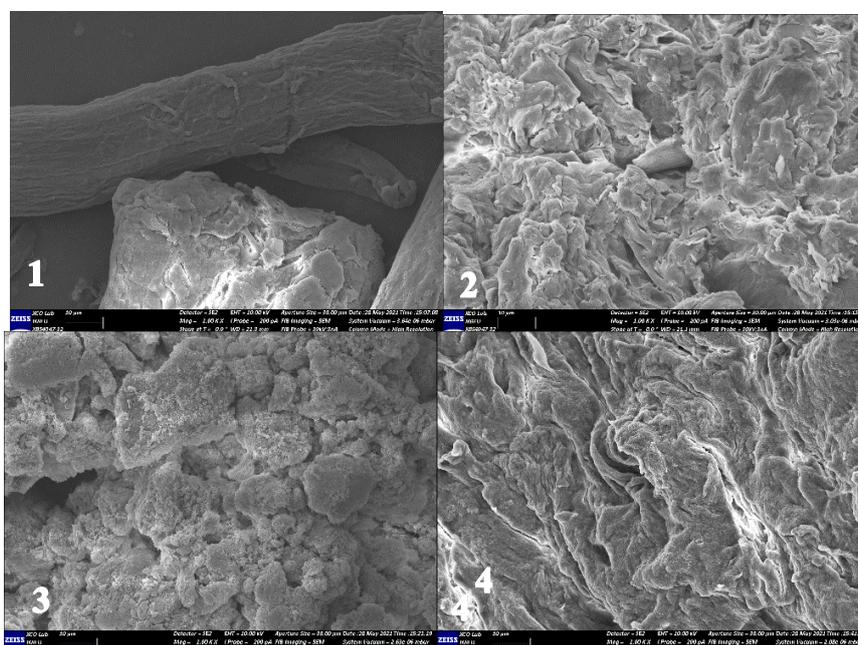


Рис. 1. Микрофотографии поверхностей образцов МКЦ

(1 – МКЦ без обработки (Ц<sub>1</sub>); 2 – МКЦ с обработкой ZnCl<sub>2</sub> (Ц<sub>2</sub>); 3 – МКЦ с обработкой NaOH (Ц<sub>3</sub>); 4 – МКЦ с обработкой H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (Ц<sub>4</sub>))

Fig. 1. Microphotographs of the surfaces of MCC samples

(1 - MCC without treatment (C<sub>1</sub>); 2 - MCC with ZnCl<sub>2</sub> treatment (C<sub>2</sub>); 3 - MCC with NaOH treatment (C<sub>3</sub>); 4 - MCC with H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> treatment (C<sub>4</sub>))

Crossbeam 540, входящей в состав уникальной научной установки «Научно-образовательный многофункциональный комплекс подготовки и проведения синхротронных исследований» (УНУ «Synchrotron-like»).

Поверхность необработанного образца МКЦ Ц<sub>1</sub> (Рис.1 1) неоднородна, заметны кристаллические грани. Структура поверхности образца Ц<sub>2</sub> (Рис.1 2) в отличие от образца Ц<sub>1</sub> более аморфна, менее упорядочена, относительно гладкие края. Структура поверхности образца Ц<sub>3</sub> (Рис.1 3) также более аморфна в сравнении с поверхностью образца Ц<sub>1</sub>, наименее измененная из трех обработанных образцов. Структура поверхности образца Ц<sub>4</sub> (Рис.1 4) наиболее аморфна, четкость граней отсутствует.

По результатам SEM изменения структуры МКЦ от наименьших к наибольшим в ряду выглядят следующим образом:

Ц<sub>1</sub> < Ц<sub>3</sub> < Ц<sub>2</sub> < Ц<sub>4</sub>

Предполагается, что реакционная способность целлюлозы напрямую зависит от модификации ее исходной структуры. Следовательно, наибольший выход редуцирующих

Таблица 3. Параметры ферментативного гидролиза для препарата «Целлюлаза»  
Table 3: Parameters of enzymatic hydrolysis for the "Cellulase" preparation

Параметры					
Варьируемые			Постоянные		
Концентрация фермента $C_{\text{фп}}$ , мг/см <sup>3</sup>	Температура T, °C	pH среды	Гидромодуль (т:ж)	Масса субстрата, г	Время ферментализации t, мин
10,0	50	<b>3,6*</b>	1:30	0,20	Определяется экспериментально по снижению выделения РВ либо выходу на плато
20,0		4,0			
30,0	<b>55</b>	<b>4,4</b>			
		5,6			
<b>40,0</b>	60	6,0			
		6,4			

\*- оптимальные параметры pH для препарата «Ксиланазы».

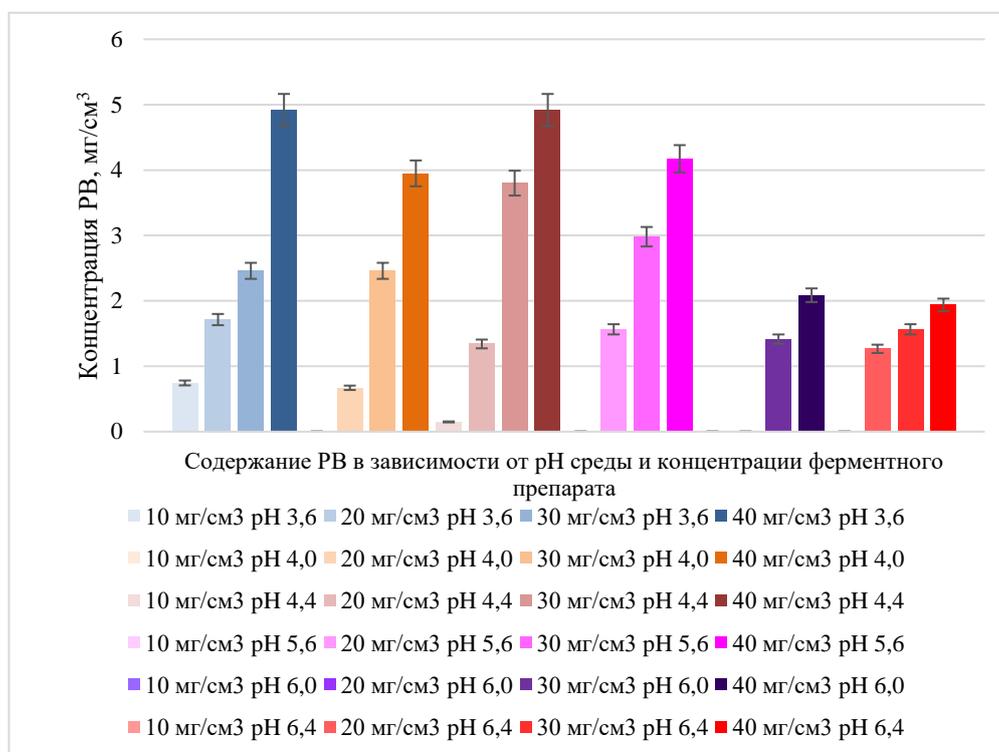


Рис. 2. Содержание РВ в зависимости от pH среды и концентрации ферментного препарата «Целлюлаза» при температуре 55 °C.

Fig. 2. RV content depending on pH of the medium and concentration of the enzyme preparation "Cellulase" at 55 °C

веществ из МКЦ может быть получен из образца, обработанного фосфорной кислотой (Ц4). Для подтверждения гипотезы на второй стадии эксперимента проводили ферментативный гидролиз полученных образцов МКЦ.

#### Подбор параметров ферментативного гидролиза

В настоящей работе исследовалось влияние ферментного препарата на выделение РВ в результате ферментативного гидролиза целлюлозы. Для эксперимента был выбран ферментный препарат «Целлюлаза» (активность 4 000 ед/г), а также его смесь с препаратом «Ксиланаза» (активность 4 000 ед/г), приобретенные у ООО «ТД «Биопрепарат». Данные ферментные препараты относятся к типу гидролаз гликозидазного действия. Выбор препарата «Целлюлаза» обусловлен его специфичностью и направленным действием по расщеплению шестичленных сахаров. В то же время известно, что при использовании смеси целлюлазы и ксиланазы с одной

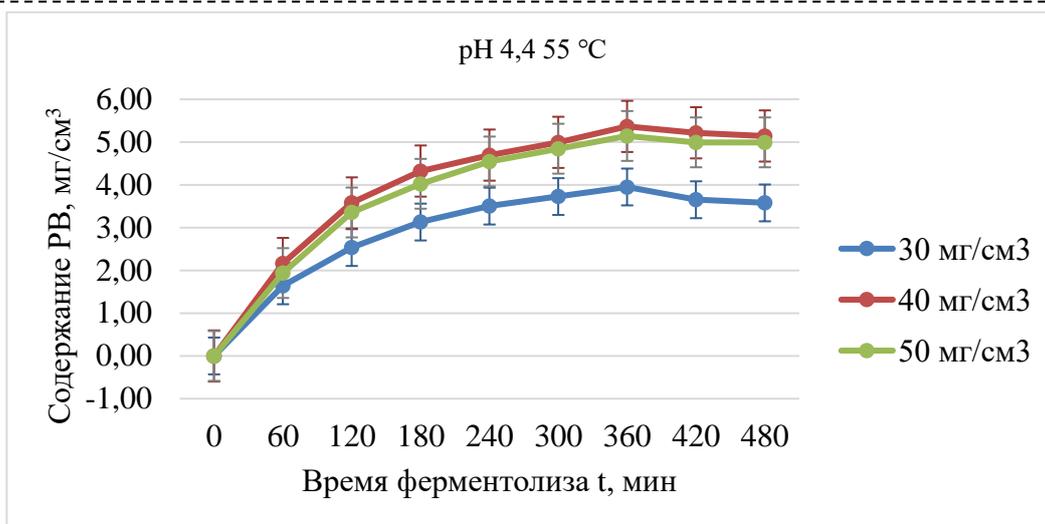


Рис. 3. Динамика ферментативного гидролиза при различных концентрациях ферментного препарата «Целлюлаза».

Fig. 3. Dynamics of enzymatic hydrolysis at different concentrations of the enzymatic preparation "Cellulase".

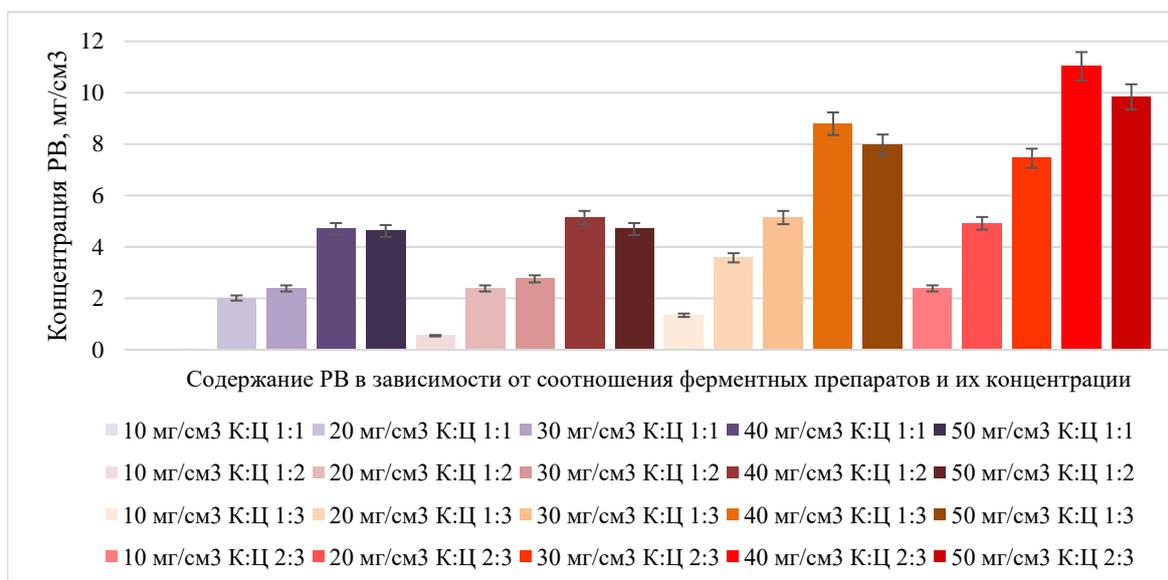


Рис. 4. Содержание восстанавливающих веществ в зависимости от соотношения ферментных препаратов и их концентрации.

Fig. 4. Content of reducing substances depending on the ratio of enzyme preparations and their concentration.

стороны наблюдается синергизм их действия при гидролизе смешанных субстратов, содержащих гемицеллюлозы и целлюлозу, а с другой стороны, ксиланаза обеспечивает дополнительное расщепление лигноуглеводных связей, частично подвергает деструкции саму целлюлозу, что должно увеличивать ее доступность, например, в процессе отбеливания сульфатной целлюлозы [8,9]. В связи с этим в рамках настоящей работы была также поставлена задача подобрать смесь ферментов «Целлюлаза» и «Ксиланаза» для максимизации выхода РВ из целлюлозы. С другой стороны, при дальнейшем масштабировании данных экспериментов придется иметь дело с реальными объектами, получаемыми из лигноцеллюлозного (растительного) сырья, которые помимо гексозных полимеров (целлюлоза) также содержат пентозные полимеры, в первую очередь на основе ксилана.

В связи с вышеизложенным были последовательно подобраны оптимальные условия ферментативного гидролиза для «Целлюлазы», а затем для смеси «Целлюлазы» и «Ксиланазы».

Граничные значения параметров ферментативного гидролиза были выбраны на основании методик [10, 11]. В качестве варьируемых параметров, влияние которых может отражаться на

выделении целевых продуктов, были выбраны: концентрация ферментного препарата; кислотность среды; температура. Постоянными оставались такие параметры, как: гидромодуль; масса субстрата; время ферментации.

#### **Подбор параметров ферментативного гидролиза для препаратов «Целлюлаза»**

При подборе параметров были учтены биохимические параметры ферментного препарата «Целлюлаза» [12].

Согласно оптимальным характеристикам ферментного препарата были определены варьируемые параметры ферментативного гидролиза (Таблица 3). Помимо этого, ферментативный гидролиз для препарата «Целлюлаза» проверялся и на параметрах, подходящих препарату «Ксиланаза» для дальнейшего подбора смеси: рН среды 5,6; 6,0; 6,4. Обозначенные параметры, хотя и не входят в оптимум «Целлюлазы», однако находятся в рабочем диапазоне рН препарата.

Методику ферментативного гидролиза для подбора параметров осуществляли согласно методике [10]. Подбор параметров производился на исходном образце МКЦ (Ц1). Содержание РВ в гидролизатах определяли медно-щелочным фотометрическим методом [13].

Оптимальная продолжительность ферментации составила  $t = 360$  мин, после чего концентрация РВ в гидролизатах не увеличивается. Наибольший выход РВ был достигнут при температуре  $55^{\circ}\text{C}$ , результаты экспериментов при которой отражены на гистограмме (Рис. 2), и концентрации ферментного препарата  $C_{\text{фп}} = 40$  мг/см<sup>3</sup>. Выделены два значения рН среды: рН = 4,4 выделено как наибольшее по содержанию РВ ( $\text{РВ} = 5,14$  мг/см<sup>3</sup>); рН = 3,6 выбрано как второе по величине содержания РВ ( $\text{РВ} = 4,92$  мг/см<sup>3</sup>) и наиболее близкое к оптимальным параметрам «Ксиланазы» для подбора смеси ферментов.

Так как наибольшее выделение РВ происходило при концентрации ферментного препарата  $C_{\text{фп}} = 40$  мг/см<sup>3</sup>, необходимо было исследовать концентрацию  $C_{\text{фп}} = 50$  мг/см<sup>3</sup> на возможность выделения большего количества РВ. Динамика ферментативного гидролиза при различных параметрах сохраняется, поэтому опыт для концентрации ферментного препарата «Целлюлаза»  $C_{\text{фп}} = 50$  мг/см<sup>3</sup> был проведен на подобранных ранее лучших по количеству образования РВ параметрах (рН = 4,4, температура  $T = 55^{\circ}\text{C}$ ) (Рис. 3).

По Рис. 3. видно, что наибольшее выделение РВ происходит при концентрации ферментного препарата  $C_{\text{фп}} = 40$  мг/см<sup>3</sup> на 360-ой минуте ферментативного гидролиза. При продолжении ферментации концентрация РВ в гидролизатах падает.

Принимая во внимание биохимические параметры для препарата «Ксиланаза», для смеси ферментов препаратов «Целлюлаза» и «Ксиланаза» были установлены следующие оптимальные условия: рН = 3,6, температура  $55^{\circ}\text{C}$  [14].

#### **Подбор параметров ферментативного гидролиза для смеси препаратов «Целлюлаза» и «Ксиланаза»**

На данном этапе работы производили подбор параметров для смеси ферментативных препаратов «Целлюлаза» (Ц) и «Ксиланаза» (К). Оптимальными соотношениями были выбраны: К:Ц = 1:1; 1:2; 1:3; 2:3. Препарат «Целлюлаза» брался равным (1:1) или в избытке за счет своих функциональных особенностей и являлся основной активностью смеси. «Ксиланаза» была выбрана как дополнительная активность. Результаты подбора представлены на Рис. 4.

Данные по концентрации РВ представлены на 240 мин ферментации. При продолжении гидролиза наблюдался спад содержания РВ. По Рис. 4 видно, что наибольшая концентрация РВ в гидролизатах достигается при смеси ферментов К:Ц = 2:3 и ее концентрации  $C_{\text{фп}} = 40$  мг/см<sup>3</sup>.

С установленными **оптимальными параметрами** (рН 3,6; температура  $T = 55^{\circ}\text{C}$ ; соотношение ферментов К:Ц = 2:3; концентрация смеси фермента  $C_{\text{фп}} = 40$  мг/см<sup>3</sup>) проводили итоговый ферментативный гидролиз на образцах целлюлозы (Ц1–Ц4), полученных в первом блоке работы. По результатам эксперимента построены графики, отражающие динамику протекания реакции ферментации (Рис. 5).

Согласно Рис. 5, образцы целлюлозы в ряду от меньшей реакционной способности к большей по результатам мониторинга выделения из них РВ в ходе ферментативного гидролиза смесью препаратов «Ксиланаза» : «Целлюлаза» 2:3 выглядят следующим образом:

$$\text{Ц1} < \text{Ц3} < \text{Ц2} < \text{Ц4}$$

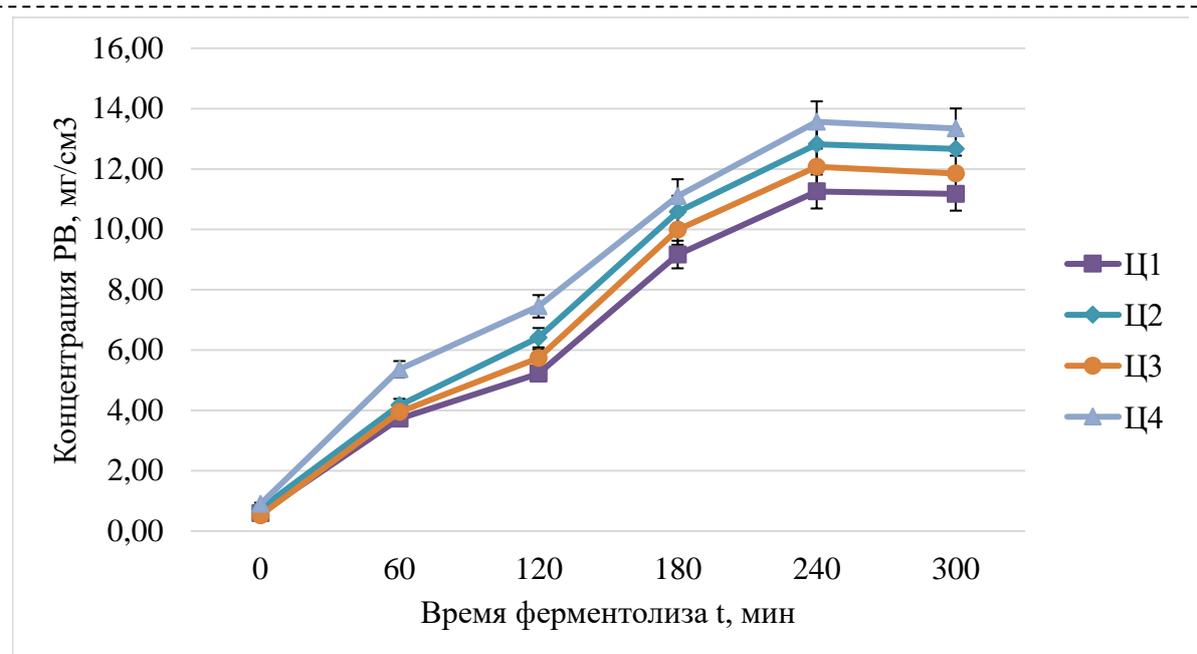


Рис. 5. Динамика ферментативного гидролиза образцов целлюлоз (Ц1-Ц7) со смесью препаратов «Ксиланаза» : «Целлюлаза» 2:3.

Fig. 5. Dynamics of enzymatic hydrolysis of cellulose samples (C1-C7) with Xylanase : Cellulase 2:3 mixture.

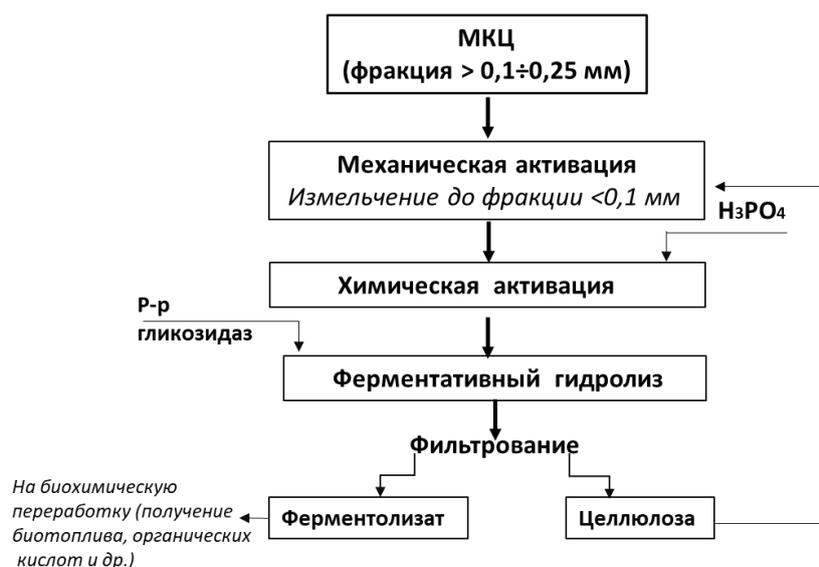


Рис. 6. Принципиальная технологическая блок-схема процесса предобработки МКЦ с последующим получением целевого продукта.

Fig. 6. Principle flowchart of the MCC pretreatment process with subsequent production of the target

Таким образом, была подтверждена гипотеза об активности образцов, сформулированная на основе анализа данных микроскопии SEM.

Полученные результаты обусловлены различной реакционной способностью образцов целлюлоз в результате различных методов обработки. Так, образец нативной целлюлозы (Ц1) ввиду плотной кристаллической структуры дает наименьший выход РВ в процессе ФГ. Выход РВ увеличивается при ферментализации образцов МКЦ, подвергшихся химической обработке, которая аморфизует структуру целлюлозы, разрушает водородные связи и уменьшает упорядоченность исходной волокнистой структуры – последовательно от образца МКЦ, обработанного раствором гидроксида натрия (Ц3), к образцу МКЦ после обработки раствором хлорида цинка (Ц2) и, наконец, до образца после обработки ортофосфорной кислотой (Ц4).

Таким образом, можно сделать вывод об эффективности использования ортофосфорной кислоты для модификации структуры микрокристаллической целлюлозы. Причем фосфорная кислота практически не гидролизует целлюлозу в отличие от агрессивных соляной и серной кислот, а происходит именно процесс растворения с сохранением первичной структуры, на чем даже основан метод измерения степени полимеризации целлюлозы по измерению вязкости ее растворов в фосфорной кислоте [15].

На основании проведенных исследований авторами предложена принципиальная технологическая схема процесса предобработки МКЦ с последующим получением целевого продукта, состоящая из таких этапов, как:

- механическая активация МКЦ [16], заключающаяся в измельчении исходной микроцеллюлозы до класса <math><0,1\text{ мм}</math>, в связи с неоднородностью фракционного состава МКЦ от различных производителей;
- химическая активация обработкой ортофосфорной кислотой в массовом соотношении Ж:Т=18:1, с последующей сушкой активированного сырья;
- смешивание (шихтование) активированной МКЦ с ферментными препаратами «Ксиланаза»:«Целлюлаза» = 2:3;
- ферментативный гидролиз с получением редуцирующих веществ (рН 3,6; температура Т = 55 °С; соотношение ферментов К:Ц=2:3; концентрация смеси фермента С<sub>фп</sub> = 40 мг/см<sup>3</sup>)
- фильтрование с отделением твердого осадка и РВ раствора, направляемых на последующую переработку. Блок-схема представлена на Рис. 6.

## ВЫВОДЫ

В ходе работы в лабораторных условиях были получены образцы МКЦ после ее обработки тремя различными реагентами (хлорид цинка, гидроксид натрия, фосфорная кислота). Были исследованы основные характеристики полученных образцов (Таблица 2). По результатам эксперимента лучшей по качеству целлюлозой является целлюлоза, полученная обработкой МКЦ раствором фосфорной кислоты (Ц8). Данный образец имеет наименьшее в ряду содержание лигнина и наибольшее содержание  $\alpha$ -целлюлозы. Качество полученных образцов по вышеуказанным параметрам уменьшается в ряду: Ц4 > Ц2 > Ц3.

Была проведена SEM полученных образцов целлюлозы (Рис. 1). По результатам анализа у всех исследуемых образцов выявлены структурные изменения по сравнению с необработанным образцом МКЦ (Ц1): у обработанных образцов МКЦ Ц2, Ц3, Ц4 в отличие от образца сравнения МКЦ Ц1 наблюдается отсутствие четких кристаллических граней, структура более аморфна. На основе SEM и выявленных структурных особенностей образцов предположен ряд, отражающий реакционную способность: Ц1 < Ц3 < Ц2 < Ц4.

Влияние методов обработки образцов целлюлозы на выделение РВ исследовали путем ферментативного гидролиза. Для проведения реакции ФГ экспериментально были подобраны параметры для ферментного препарата «Целлюлаза». Границы параметров определяли в соответствии с характеристиками ферментных препаратов. Постоянными параметрами являлись: гидромодуль (1:30), масса субстрата (0,20 г). Варьируемыми параметрами являлись: концентрация ферментного препарата, температура, рН среды, продолжительность процесса.

Лучшими условиями для препарата «Целлюлаза» являются: рН = 4,4, концентрация ферментного препарата С<sub>фп</sub> = 40 мг/см<sup>3</sup>, температура Т = 55°С; при постоянных параметрах: масса субстрата 0,20 г, гидромодуль (тв:ж) = 1:30, время ферментации t = 360 мин (Рис. 2). При данных условиях достигается максимальная концентрация РВ = 5,14 мг/см<sup>3</sup>. Для повышения выхода РВ в гидролизатах экспериментально подбирали соотношения смеси препаратов «Целлюлаза» и «Ксиланаза» для изучения их совместного гидролитического действия на исследуемые образцы целлюлозы. Опытным путем было выявлено лучшее соотношение К:Ц = 2:3 (Рис. 4). При таком параметре на образце Ц1 выделяется РВ = 18,48 мг/см<sup>3</sup>, что позволяет значительно увеличить выход целевого продукта.

Далее в установленных оптимальных условиях был проведен ферментативный гидролиз всех четырех исследуемых образцов целлюлозы смесью ферментных препаратов в соотношении 2:3. Было установлено максимальное выделение РВ для каждого образца (Рис. 5). Образцы от наименьшего выделения РВ к наибольшему расположены в ряду: Ц1 < Ц3 < Ц2 < Ц4, что подтвердило выдвинутую ранее гипотезу о реакционной способности после анализа морфологии

образцов по результатам SEM. Таким образом, образец предварительной обработанный фосфорной кислотой демонстрирует наибольший выход РВ после ФГ.

На основании проведенных исследований предложена принципиальная технологическая схема процесса предобработки МКЦ с последующим получением целевого продукта.

*Авторы выражают благодарность Ивану Игоревичу Лятуну, научному сотруднику МНИЦ «Когерентная рентгеновская оптика для установок «Мегасайенс» (МНИЦ «РО») БФУ им. И. Канта за проведение SEM образцов целлюлозы.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kumar A. K., Sharma S. Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review // *Bioresources and Bioprocessing*. 2017. Vol. 4, issue 1. P. 1-19. DOI: 10.1186/s40643-017-0137-9.
2. Варфоломеев С. Д., Моисеев И. И., Мясоедов Б. Ф. Энергоносители из возобновляемого сырья химические аспекты // *Вестник Российской академии наук*. 2009. Т. 79. № 7. С. 595-604.
3. Baral N. R. [et al.] Approaches for more efficient biological conversion of lignocellulosic feedstocks to biofuels and bioproducts // *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2019. Vol. 7, issue 10. P. 9062-9079. DOI: 10.1021/acssuschemeng.9b01229.
4. Callegari A. [et al.] Production technologies, current role, and future prospects of biofuels feedstocks: a state-of-the-art review // *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 2020. Vol. 50, issue 4. P. 384-436. DOI: 10.1080/10643389.2019.1629801.
5. Cao N. J. [et al.] Cellulose hydrolysis using zinc chloride as a solvent and catalyst // *Applied biochemistry and biotechnology*. 1994. Vol. 45, issue 1. P. 521-530. DOI: 10.1007/BF02941827.
6. Bhattacharya S., Biswas P. K., Tolbert M. E. M. Comparison of the effectiveness of various pretreatment methods on the enzymatic hydrolysis of sweet potato (*Ipomoea batatas L.*) biomass // *Biological Wastes*. 1987. Vol. 19. Issue 3. P. 215-226. DOI: 10.1016/0269-7483(87)90054-1.
7. Zhang J. [et al.] Effect of phosphoric acid pretreatment on enzymatic hydrolysis of microcrystalline cellulose // *Biotechnology advances*. 2010. Vol. 28. Issue 5. P. 613-619. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2010.05.010.
8. Забодалова Л. А. [и др.] Применение ферментативного гидролиза в технологии белковых концентратов из люпина // *Научный журнал НИУ ИТМО. Серия «Процессы и аппараты пищевых производств»*. 2012. № 2. С. 21.
9. Лобова И. В. [и др.] Влияние продолжительности ферментной обработки ксиланазы на белимость сульфатной целлюлозы // *Известия высших учебных заведений. Лесной журнал*. 2005. № 1-2. С. 79-86.
10. Зиновьева М. Е., Волкова Т. С., Шафигуллина Н. Ф. Особенности ферментативного гидролиза целлюлозосодержащего сырья ферментным препаратом «Целлолюкс-А» // *Вестник технологического университета*. 2018. Т. 21. № 3. С. 56-58.
11. Вазетдинова А. А. [и др.] Ферментализация целлюлозосодержащих остатков производства фурфурола из отходов растительного сырья // *Башкирский химический журнал*. 2017. Т. 24. № 1. С. 27-31.
12. ООО «Торговый дом «БиоПрепарат» [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://tdbiopreparat.ru/docs/tsellulaza.pdf>. – [22.01.2022].
13. Хабаров Ю. Г., Камакина Н. Д., Вешняков В. А. Фотометрический метод количественного определения редуцирующих сахаров в растворах // *Известия высших учебных заведений. Лесной журнал*. 2008. № 5. С. 129-134.
14. ООО «Торговый дом «БиоПрепарат» [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://tdbiopreparat.ru/docs/ksilanaza.pdf>. – [22.01.2022].
15. Оболенская А. В. [и др.] Практические работы по химии древесины и целлюлозы. М. : Лесная промышленность, 1965. 412 с.
16. Пестунов А. В., Кузьмин А. О., Яценко Д. А., Правдина М. Х., Таран О. П. Механическая активация чистой и содержащейся в древесных опилках целлюлозы в мельницах различного типа // *Журнал СФУ. Химия*. 2015. № 3. С. 386-400. DOI: 10.17516/1998-2836-2015-8-3-386-400.

© 2022 Авторы. Эта статья доступна по лицензии Creative Commons «Attribution» («Атрибуция») 4.0 Всемирная (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

*Об авторах:*

**Масютин Яков Андреевич**, Балтийский федеральный университет имени И. Канта (236016, Россия, г. Калининград, ул. А. Невского, 14), кандидат химических наук, доцент, yma1989@mail.ru

**Ван Елена Юрьевна**, Балтийский федеральный университет имени И. Канта (236016, Россия, г. Калининград, ул. А. Невского, 14), кандидат технических наук, доцент, evan@kantiana.ru

**Смага Мария Артуровна**, магистрант, Балтийский федеральный университет имени И. Канта (236016, Россия, г. Калининград, ул. А. Невского, 14), specialforschool33@mail.ru

**Басова Юлия Сергеевна**, магистрант, Балтийский федеральный университет имени И. Канта (236016, Россия, г. Калининград, ул. А. Невского, 14), lastochka-99@bk.ru

**Михайлов Владимир Геннадьевич**, Кузбасский государственный технический университет имени Т.Ф. Горбачева (650000, Россия, г. Кемерово, ул. Весенняя, 28), кандидат технических наук, доцент, inara\_azizyan@mail.ru

*Заявленный вклад авторов:*

Масютин Я.А. - постановка исследовательской задачи; научный менеджмент; обзор соответствующей литературы; концептуализация исследования; написание текста, сбор и анализ данных; обзор соответствующей литературы; выводы; написание текста.

Ван Е.Ю. - постановка исследовательской задачи; научный менеджмент; обзор соответствующей литературы; концептуализация исследования; написание текста, сбор и анализ данных; обзор соответствующей литературы; выводы; написание текста.

Смага М.А. - постановка исследовательской задачи; научный менеджмент; обзор соответствующей литературы; концептуализация исследования; написание текста, сбор и анализ данных; обзор соответствующей литературы; выводы; написание текста.

Басова Ю.С. - постановка исследовательской задачи; научный менеджмент; обзор соответствующей литературы; концептуализация исследования; написание текста, сбор и анализ данных; обзор соответствующей литературы; выводы; написание текста.

Михайлов В.Г. - постановка исследовательской задачи; научный менеджмент; обзор соответствующей литературы; концептуализация исследования; написание текста, сбор и анализ данных; обзор соответствующей литературы; выводы; написание текста.

*Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.*

**Original article****STUDY OF THE IMPACT OF PRETREATMENT METHOD  
OF MICROCRYSTALLINE CELLULOSE AND ITS ENZYME HYDROLYSIS  
CONDITIONS ON YIELD OF REDUCING SUBSTANCES**

**Iakov A. Masiutin<sup>1</sup>, Elena Iu. Van<sup>1</sup>,  
Maria A. Smaga<sup>1</sup>, Julia S. Basova<sup>1</sup>,  
Vladimir G. Mikhailov<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Immanuel Kant Baltic Federal University, 14 A. Nevsky str., Kaliningrad, 236016, Russia

<sup>2</sup>T.F. Gorbachev Kuzbass State Technical University, 28 street Vesennaya, Kemerovo, 650000, Russian Federation

\*for correspondence: yma1989@mail.ru

**Article info**

Submitted:

31 December 2021

Approved after reviewing:

30 January 2022

**Abstract.**

*Nowadays, an active search for alternative natural, ecological and environmentally friendly energy sources is being studied in connection with a complex of factors that complicate the recovery and processing of conventional fossil resources, and their negative impact on the environment. Lignocellulosic plant material is the most abundant polymer on Earth, and its reserves are practically inexhaustible. Cellulose obtained from lignocellulose is used as a model substrate for testing its conversion in fuel products. The study is aimed at the investigation of the impact of an enzyme*

Accepted for publication:  
25 February 2022

**Keywords:** microcrystalline cellulose, glucose, reducing substances, enzyme hydrolysis, enzyme composition, bioethanol, chemical engineering of fuels, biotechnology.

composition and methods microcrystalline cellulose pretreatment on reducing substances yields. The research methods in the study were weight analysis to assess the yield of cellulose and lignin content; photometric method for the determination of  $\alpha$ -cellulose; SEM to evaluate the results of chemical pretreatment of cellulose; photometric method for determining reducing substances. As a result, the effect of pretreatment of microcrystalline cellulose with various reagents ( $ZnCl_2$ ,  $NaOH$ ,  $H_3PO_4$ ) on the yield of reducing substances was studied. The optimal conditions for enzymatic hydrolysis for the composition "Cellulase" were found. The optimal ratio of the enzyme preparations "Cellulase" and "Xylanase" was experimentally established in order to maximize the yield of reducing substances, and all the studied samples were hydrolyzed with this mixture of enzymes in the established ratio. The content of reducing substances in terms of glucose in the hydrolyzates was determined by the photometric method by reaction with a copper-alkaline reagent. The principal technological scheme for the processing of cellulose-containing raw materials into products with high added value for fuel purposes is also proposed.

**For citation** Masiutin I.A., Van E.Iu., Smaga M.A., Basova J.S., Mikhailov V.G. Study of the impact of pretreatment method of microcrystalline cellulose and its enzyme hydrolysis conditions on yield of reducing substances. *Vestnik Kuzbasskogo gosudarstvennogo tekhnicheskogo universiteta*=Bulletin of the Kuzbass State Technical University. 2022; 1(149):44-55. (In Russ., abstract in Eng.). doi: 10.26730/1999-4125-2022-1-44-55

## REFERENCES

1. Kumar A. K., Sharma S. Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review. *Bioresources and Bioprocessing*. 2017; 4(1):1-19. DOI: 10.1186/s40643-017-0137-9.
2. Varfolomeev S. D., Moiseev I. I., Myasoedov B. F. Energonositeli iz vozobnovlyаемого syr'ya khimicheskie aspekty [Energy resources from renewable raw materials chemical aspects]. *Vestnik Rossiyskoy akademii nauk [Bulletin of Russian Academy of Sciences]*. 2009; 79(7):595-604.
3. Baral N. R. [et al.] Approaches for more efficient biological conversion of lignocellulosic feedstocks to biofuels and bioproducts. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2019; 7(10):9062-9079. DOI: 10.1021/acssuschemeng.9b01229.
4. Callegari A. [et al.] Production technologies, current role, and future prospects of biofuels feedstocks: a state-of-the-art review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 2020; 50(4):384-436. DOI: 10.1080/10643389.2019.1629801.
5. Cao N. J. [et al.] Cellulose hydrolysis using zinc chloride as a solvent and catalyst. *Applied biochemistry and biotechnology*. 1994; 45(1):521-530. DOI: 10.1007/BF02941827.
6. Bhattacharya S., Biswas P. K., Tolbert M. E. M. Comparison of the effectiveness of various pretreatment methods on the enzymatic hydrolysis of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) biomass. *Biological Wastes*. 1987; 19(3):215-226. DOI: 10.1016/0269-7483(87)90054-1.
7. Zhang J. [et al.] Effect of phosphoric acid pretreatment on enzymatic hydrolysis of microcrystalline cellulose. *Biotechnology advances*. 2010; 28(5):613-619. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2010.05.010.
8. Zabodalova L. A. [et al.] Primenenie fermentativnogo gidroliza v tekhnologii belkovykh kontsentratov iz lyupina [The use of enzymatic hydrolysis in the technology of protein concentrates from lupine]. *Nauchnyy zhurnal NIU ITMO. Seriya «Protessy i apparaty pishchevykh proizvodstv» [Scientific journal NRU ITMO. Series "Processes and apparatuses of food production"]*. 2012; 2:21.
9. Lobo I. V. [et al.] Vliyanie prodolzhitel'nosti fermentnoy obrabotki ksilanazami na belimost' sul'fatnoy tsellyulozy [Effect of the duration of enzymatic treatment with xylanases on the whiteness of sulfate cellulose]. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zave-deni. Lesnoy zhurnal [News of higher educational institutions. Forest journal]*. 2005; 1-2:79-86.
10. Zinov'eva M. E., Volkova T. S., Shafigullina N. F. Osobennosti fermentativnogo gidroliza tsellyulozosoderzhashchego syr'ya fermentnym preparatom «Tsellolyuks-A» [Features of enzymatic hydrolysis of cellulose-containing raw materials by the enzyme preparation "Cellolux-A"]. *Vestnik tekhnologicheskogo universiteta [Bulletin of the Technological University]*. 2018; 21(3):56-58.
11. Vazetdinova A. A. [et al.] Fermentoliz tsellyulozosoderzhashchikh ostatkov proizvodstva furfurola iz otkhodov rastitel'nogo syr'ya [Fermentolysis of cellulose-containing residues of furfural production from vegetable raw materials waste]. *Bashkirskiy khimicheskyy zhurnal [Bashkir Chemical Journal]*. 2017; 24(1):27-31.
12. LLC "Trading House "BioPreparat" [OOO "Torgovyy dom "BioPreparat"]. URL: <https://tdbiopreparat.ru/docs/tsellulaza.pdf> (accessed: 22.01.2022).
13. Khabarov Yu. G., Kamakina N. D., Veshnyakov V. A. Fotometricheskyy metod kolichestvennogo opredeleniya

redutsiruyushchikh sakharov v rastvorakh [Photometric method for the quantitative determination of reducing sugars in solutions]. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedeniy. Lesnoy zhurnal [News of higher educational institutions. Forest journal]*. 2008; 5:129-134

14.LLC "Trading House "BioPreparat" [ООО "Торговый дом "BioPreparat"]. URL: <https://tdbiopreparat.ru/docs/ksilanaza.pdf> (accessed: 22.01.2022).

15.Obolenskaya A.V. [et al.] *Prakticheskie raboty po khimii drevesiny i tsellyulozy [Practical work on the chemistry of wood and cellulose]*. Moscow, Forest Industry Publishing; 1965. 412 P.

16.Pestunov A.V., Kuz'min A.O., YAcenko D.A., Pravdina M.H., Taran O.P. *Mekhanicheskaya aktivatsiya chistoy i sodержashcheysya v drevesnykh opilkah cellyulozy v mel'nicah razlichnogo tipa [Mechanical activation of pure and sawdust-containing cellulose in mills of various types]*. *Zhurnal SFU. Khimiya [Journal of Siberian Federal University. Chemistry]*. 2015; 3:386-400. DOI: 10.17516/1998-2836-2015-8-3-386-400.

© 2022 The Authors. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

*The authors declare no conflict of interest.*

*About the authors:*

**Iakov A. Masiutin**, Immanuel Kant Baltic Federal University (14 A. Nevsky str., Kaliningrad, 236016, Russia), C. Sc. in Chemistry, associate professor, yma1989@mail.ru

**Elena Iu. Van**, Immanuel Kant Baltic Federal University (14 A. Nevsky str., Kaliningrad, 236016, Russia), C. Sc. in Engineering, associate professor, evan@kantiana.ru

**Maria A. Smaga**, undergraduate, Immanuel Kant Baltic Federal University (14 A. Nevsky str., Kaliningrad, 236016, Russia), specialforschool33@mail.ru

**Julia S. Basova**, undergraduate, Immanuel Kant Baltic Federal University (14 A. Nevsky str., Kaliningrad, 236016, Russia), lastochka-99@bk.ru

**Vladimir G. Mikhailov**, T.F. Gorbachev Kuzbass State Technical University (28 street Vesennyaya, Kemerovo, 650000, Russian Federation), C. Sc. in Engineering, associate professor, mvg.eohp@kuzstu.ru

*Contribution of the authors:*

Iakov A. Masiutin - research problem statement; scientific management; reviewing the relevant literature; conceptualisation of research; writing the text, data collection; data analysis; reviewing the relevant literature; drawing the conclusions; writing the text.

Elena Iu. Van - research problem statement; scientific management; reviewing the relevant literature; conceptualisation of research; writing the text, data collection; data analysis; reviewing the relevant literature; drawing the conclusions; writing the text.

Maria A. Smaga - research problem statement; scientific management; reviewing the relevant literature; conceptualisation of research; writing the text, data collection; data analysis; reviewing the relevant literature; drawing the conclusions; writing the text.

Julia S. Basova - research problem statement; scientific management; reviewing the relevant literature; conceptualisation of research; writing the text, data collection; data analysis; reviewing the relevant literature; drawing the conclusions; writing the text.

Vladimir G. Mikhailov - research problem statement; scientific management; reviewing the relevant literature; conceptualisation of research; writing the text, data collection; data analysis; reviewing the relevant literature; drawing the conclusions; writing the text.

*All authors have read and approved the final manuscript.*