

УДК 543.422:628.3

ОБРАБОТКА ОЗОНОМ КАК МЕТОД ПОВЫШЕНИЯ РЕАКЦИОННОЙ СПОСОБНОСТИ СОЛОМЫ ПШЕНИЦЫ В ПРОЦЕССАХ БИОКОНВЕРСИИ В МОНОСАХАРИДЫ

Бенько Е.М., Мамлеева Н.А., Харланов А.Н.

*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Химический факультет,
119991, Москва, Ленинские горы, дом 1, строение 3, ГСП-1*

E-mail: benko_elena@mail.ru

Исследована делигнификация соломы пшеницы при обработке озоном. Определена зависимость содержания остаточного лигнина от удельного поглощения озона. Данные ИК- и КР-спектроскопии образцов соломы различной степени делигнификации отражают динамику озонолитической деструкции лигнина. Показано согласованное удаление лигнина и гемицеллюлоз соломы. В широком интервале расходов озона аморфизации целлюлозы не наблюдается. Установлена связь между расходом озона и реакционной способностью озонированной соломы в процессах ферментативного гидролиза в сахара. Оптимальный расход озона составляет ~2-3 мол. экв. О₃ на фенилпропановую структурную единицу (ФПЕ) содержащегося в соломе лигнина.

Ключевые слова: озон, лигнин, делигнификация, солома пшеницы, растительное сырье

Биотехнологическая переработка возобновляемого растительного сырья позволяет получать разнообразные коммерчески востребованные продукты, включая этанол из целлюлозы (биотопливо второго поколения). Помимо отходов от заготовки и переработки древесины, перспективным сырьём для биоконверсии могут быть сельскохозяйственные отходы, состоящие, в основном, из однолетней биомассы. В России — это преимущественно солома злаковых культур [1].

Характерными особенностями однолетних растений являются относительно низкое содержание лигнина и тонкостенная структура. Это, в целом, облегчает процесс предварительной делигнификации лигноцеллюлозной биомассы, цель которой повысить доступность целлюлозы для ферментов. Обработка растительного сырья озоном имеет ряд преимуществ перед другими методами делигнификации, что обусловлено высокой активностью и селективностью озона по отношению к лигнину и экологической безопасностью процесса [2].

Для выяснения общих закономерностей деструкции лигноцеллюлозной биомассы при озонировании и оптимизации метода озонной делигнификации в настоящей работе изучена динамика структурных превращений лигноуглеводного комплекса соломы пшеницы с помощью ИК-спектроскопии и спектроскопии комбинационного рассеяния. Также проанализирована взаимосвязь между расходом озона, содержанием лигнина, структурными характеристиками растительного субстрата и его реакционной способностью в процессах ферментативного гидролиза в сахара.

Исследовали образцы соломы пшеницы (*Triticum L.*) с содержанием лигнина (ЛГ) - 20%, целлюлозы (ЦЛ) - 40%, гемицеллюлоз (ГЦ) - 24%. Размер частиц 0,6-1,0 мм. Для озонирования использовали образцы с содержанием воды ~ 100% на грамм абсолютно-сухого материала. Озонирование проводили в проточном реакторе при комнатной температуре. Методика озонирования и расчет количества поглощенного озона (удельный расход) описаны в [3-5]. Озонированные образцы промывали водой и высушивали на воздухе.

Содержание лигнина определяли по стандартной методике с помощью двухстадийного гидролиза серной кислотой.

ИК-спектры образцов регистрировали на ИК-Фурье спектрометре Equinox 55/S (Bruker) в режиме пропускания. Воздушно-сухие образцы предварительно промытой соломы дополнительно измельчали, смешивали с KBr в соотношении 1:850 и прессовали.

Спектры КР регистрировали на приборе Bruker Equinox 55/S, с приставкой FRA 106/S. Длина волны возбуждающего излучения 1064 нм, мощность лазера 850 мВт, размер пятна 0,1 мм. Экспериментальные спектры КР корректировались вычитанием фона и нормировались к интенсивности полосы 1096 см^{-1} в программе OPUS 6.0 (Bruker).

Ферментативный гидролиз проводили с использованием коммерческого препарата целлюлазного комплекса *Trichoderma Viride* «Целловиридин Г 20 X» (50°C ; pH 5,0; 48 час) Общее количество восстанавливающих сахаров определяли по методу Шомоди-Нельсона. Содержание глюкозы анализировали колориметрически глюкозо-оксидазным методом, используя набор реактивов «Глюкоза-Агат» фирмы ООО «Агат-Мед».

Характеристика исследованных образцов (время озонирования, удельный расход озона, содержание лигнина и степень делигнификации) приведены в табл. 1.

Таблица 1. Характеристика образцов соломы пшеницы

№ образца	1	2	3	4	5
Время озонирования, мин	0	15	30	90	240
Удельный расход озона, ммоль/г	0	0,8	2,0	3,2	7,0
Содержание лигнина, %	19,1	15,5	10,1	7,3	6,6
Степень делигнификации, %	0	42	53	62	65

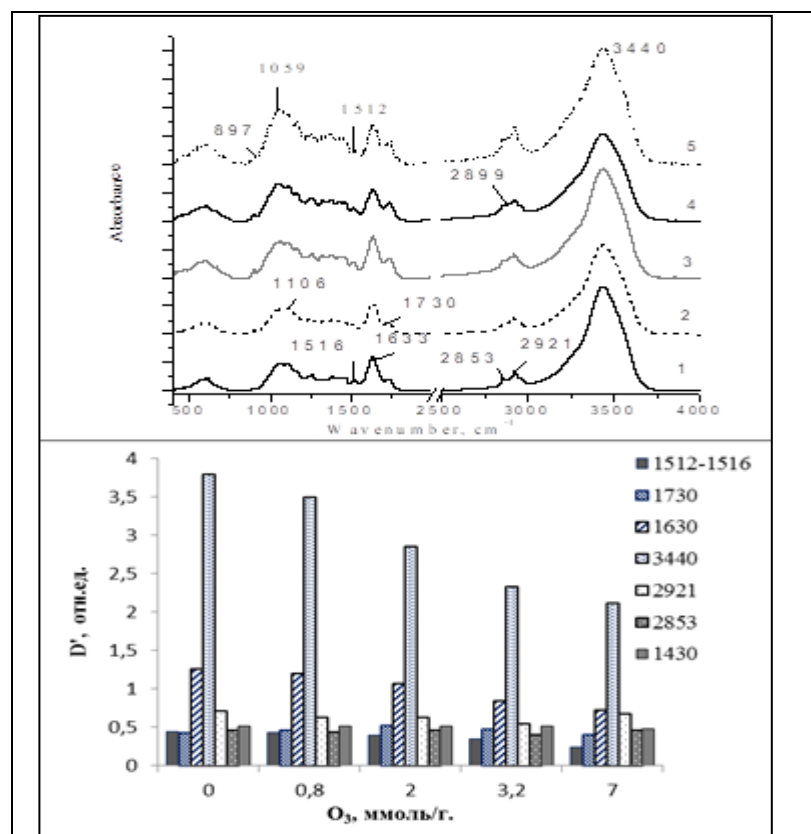


Рис.1. ИК спектры поглощения образцов озонированной соломы (а). Относительная оптическая плотность ($D'_v = D_v/D_{1059}$) ИК- полос поглощения озонированных образцов (б). Удельный расход озона, ммоль/г: 0 (1); 0,8 (2); 2,0 (3); 3,2 (4); 7,0 (5).

D'_{1430} валентных колебаний ароматических структур также уменьшается.

Полоса поглощения 1730 см^{-1} валентных $\text{C}=\text{O}$ колебаний карбоксильных групп кислот и сложных эфиров, а также карбонильных групп, характерных для гемицеллюлоз. Значение D'_{1730} возрастает при поглощении первых порций озона. Содержание карбоксильных и карбонильных групп в образце, невелико и уменьшается при увеличении расхода озона (образцы 4 и 5).

На рис. 1 представлены ИК спектры поглощения образцов соломы пшеницы при различных значениях удельного расхода озона. Обработка озоном приводит к изменениям оптической плотности многих полос поглощения. Особенно заметно возрастание оптической плотности (D) полосы поглощения 1059 см^{-1} , соответствующей $\text{C}-\text{O}$ валентным колебаниям $\text{C}_3\text{H}-\text{OH}$ группы целлюлозы [1], что указывает на возрастание содержания целлюлозы в озонированных образцах. На рисунке 2 приведены значения относительной оптической плотности $D'_v = D_v/D_{1059}$ некоторых полос поглощения. Полоса 1630 см^{-1} представляет собой суперпозицию валентных $\text{C}-\text{C}$ колебаний ароматического кольца (1595 см^{-1}) и деформационных $\text{O}-\text{H}$ колебаний кристаллизационной воды. Симбатный характер изменения D'_{1630} и D'_{1513} по мере увеличения расхода озона свидетельствует о разрушении ароматики. Значение

Интенсивность полосы поглощения при 3430 см^{-1} (валентные колебания ОН - групп, участвующих в водородных связях) в спектрах озонированных образцов снижена.

Полуширина полосы увеличивается в направлении области с более низкими волновыми числами от 240 см^{-1} (исходный образец) до 300 см^{-1} в (спектр 5) по мере увеличения количества поглощенного озона, что свидетельствует об образовании более сильных водородных связей и является следствием удаления части аморфной фазы (лигнина и гемицеллюлозы). Таким образом, анализ ИК- спектров показывает, что обработка озоном соломы пшеницы приводит к удалению части лигнина и увеличению содержания целлюлозы.

На рис. 2 приведены спектры КР и изменения относительной интенсивности некоторых характеристических полос поглощения структурных элементов биомассы в зависимости от количества поглощенного озона. Интерпретация полос поглощения представлена в табл. 2.

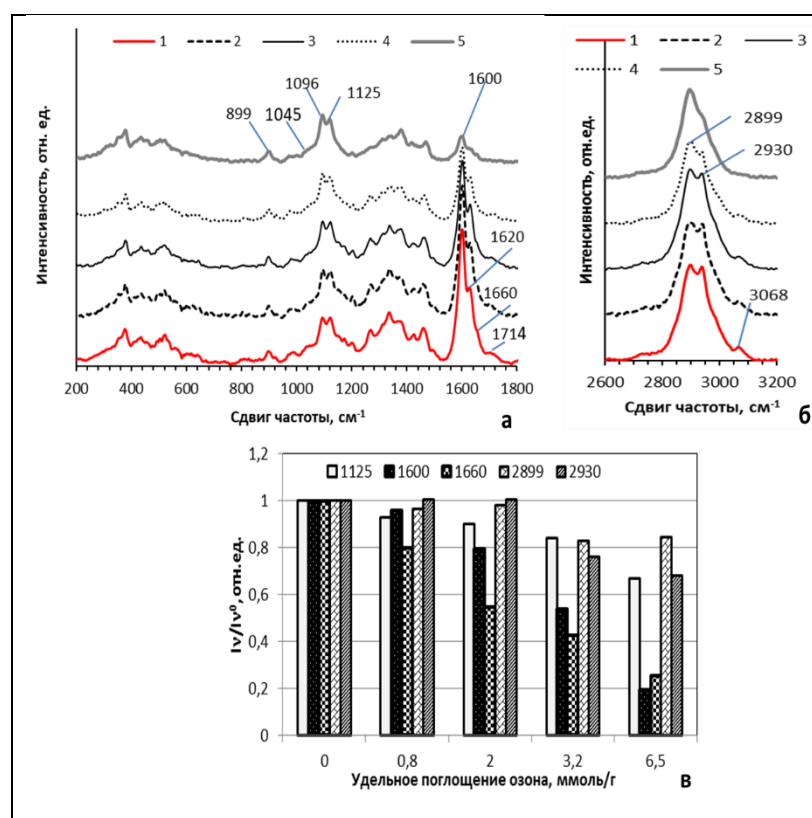


Рис.2. Спектры КР образцов озонированной соломы в интервале $200\text{-}1800\text{ см}^{-1}$ (а) и $2600\text{-}3200\text{ см}^{-1}$ (б). Интенсивность полос в спектре КР в зависимости от удельного расхода озона (в). Удельный расход озона, ммоль/г: 0 (1); 0,8 (2); 2,0 (3); 3,2 (4); 7,0 (5).

разрушении. Согласно данным спектров КР, в широком интервале расходов озона аморфизации целлюлозы не происходит.

Спектры КР также свидетельствуют о том, что обработка соломы озоном вызывает деструкцию ароматических структур макромолекулы ЛГ. Это соответствует данным химического анализа содержания лигнина (таблица 1), согласно которым при удельном расходе озона ~ 2 ммоль/г содержание остаточного лигнина падает на $\sim 50\%$, а при расходе озона 7 ммоль/г, – на $\sim 70\%$.

В спектрах КР отчетливо видно уменьшение содержания структур ксилана в составе гемицеллюлоз озонированных образцов. Особенности состава гемицеллюлоз соломы пшеницы, в которых преобладают структуры ксилана, позволили с помощью спектров КР наблюдать корреляцию между содержанием лигнина и гемицеллюлоз в озонированных образцах и сделать вывод об их взаимосвязанном

Таблица 2. Характеристические полосы структурных элементов биомассы в спектре КР

Волновое число, см^{-1}	Компонент биомассы	Отнесение полосы
2930	ЛГ	валентные С-Н в CH_3 и OCH_3 (асимм.)
2899	ЦЛ+ГЦ (ксилан)	валентные С-Н и С-Н ₂
1660	ЛГ	валентные С=С, сопр. с ар. кольцом в кониферил. альдегиде
1600	ЛГ	валентные С-С ароматического кольца (симм)
1125	ГЦ (ксилан)	валентные глюкопиранозного кольца

Данные КР и ИКС показывают, что и даже при относительно высоких значениях удельного поглощения озона (~ 7 ммоль/г) интенсивность полос, характерных для ароматического кольца лигнина, остается достаточно высокой, т.е. часть лигнина мало доступна озону [3-5].

В процессе озонолитической деструкции лигнина образуются кислоты (щавелевая, глиоксальная, муравьиная и др.) с высокой концентрацией. В условиях кислой среды происходит частичный гидролиз сложноэфирных связей в структуре биомассы. При последующей обработке озонированных образцов водой продукты озонирования и гидролиза удаляются. В результате содержание лигнина и гемицеллюлоз в образце существенно уменьшается.

Зависимость выхода восстанавливающих сахаров (ВС) и глюкозы (ГЛ) при ферментативном гидролизе соломы от количества поглощенного озона приведена на рис.3. Пунктирная кривая отражает процесс удаления лигнина в ходе озонирования.

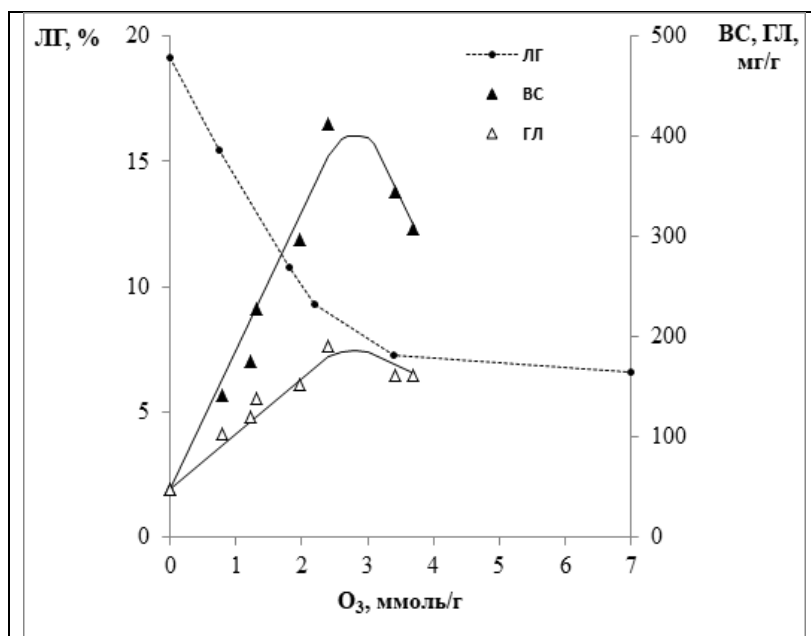


Рис.3. Содержание остаточного лигнина (ЛГ) и выход восстанавливающих сахаров (ВС) и глюкозы (ГЛ) при ферментативном гидролизе соломы пшеницы в зависимости от количества поглощенного озона.

Как видно из рисунка, содержание лигнина практически линейно падает, а выход сахаров линейно возрастает по мере увеличения дозы поглощенного озона. Максимальное значение выхода ВС на порядок выше, чем у необработанного субстрата. Оно достигается при расходе О₃ 2,5-3 ммоль О₃/г, что в пересчете на фенилпропановую (ФПЕ) структурную субъединицу ЛГ, содержащегося в образце, составляет $\sim 2,5-3$ экв.О₃/ФПЕ. Полученные результаты косвенно свидетельствуют о том, что на начальной стадии озонирования озон преимущественно расходуется на взаимодействие с непердежными структурными фрагментами лигнина. Однако при удалении более 60% лигнина эффективность делигнификации

резко падает, а выход продуктов ферментативного гидролиза уменьшается. Полученный результат находится в соответствии с представлением о том, что лигнин, содержащийся в лигноцеллюлозной биомассе, является основным препятствием для ферментов в процессе гидролиза целлюлозы.

В результате обработки озоном в растительном субстрате происходят структурные изменения. Согласно данным сканирующей электронной микроскопии [4], клеточные стенки озонированной соломы теряют жесткость, деформируются. При частичном удалении лигнина и гемицеллюлозы между микрофибриллами целлюлозы (МФЦ) образуется пространство для свободного проникновения воды и реагентов, диаметр МФЦ заметно увеличивается, что является следствием набухания целлюлозы. Такие превращения приводят к возрастанию реакционной способности субстрата. Однако при больших дозах озона МФЦ слипаются, образуя более компактную структуру.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о наличии оптимальной степени делигнификации соломы пшеницы - расход озона 2-3 ммоль/г (2-3 моль О₃/моль ФПЕ), содержание остаточного лигнина 10%, когда целлюлоза становится более доступной для ферментов в процессах биоконверсии в сахара.

Благодарности. Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Нанохимия и наноматериалы» при Химическом факультете МГУ имени М.В. Ломоносова при финансовой поддержке Минобрнауки РФ в рамках Госбюджетной темы: «Физикохимия поверхности, адсорбция и катализ» ААА-А21-121011990019-4.

Библиографический список

1. Синицын А.П., Синицына О.А. Биоконверсия возобновляемой растительной биомассы на примере биотоплива второго поколения: сырье, переработка, ферменты, процессы, экономика // Успехи биологической химии, т. 61, 2021, с. 347–344.
2. Travaini R.S. Ozonolysis: An advantageous pretreatment for lignocellulosic biomass revisited // Bioresour. Technol, 2016, Vol. 199, pp.2-12.
3. Бенько Е.М., Чухчин Д.Г., Мамлеева Н.А., Харланов А.Н., Лунин В.В. Озонолитическая делигнификация соломы пшеницы // Ж. физ. химии, 2020, т. 94, № 8, с. 1153-1160.
4. Ben'ko E.M., Chukhchin D.G., Lunin V.V. Changes in wheat straw cell walls during ozone pretreatment // Holzforschung, 2020, v. 74, N 12, P. 1157-1167.
5. Мамлеева Н.А., Бенько Е.М., Харланов А.Н., Шумянцев А.В. Превращения лигноуглеводного комплекса Triticum L. при делигнификации озоном // Ж. физ. химии, 2022, т. 96, № 11, с. 1584-1592.