

## ОБРАБОТКА ОЗОНОМ И БИОКОНВЕРСИЯ В МОНОСАХАРИДЫ ДРЕВЕСИНЫ СОСНЫ

© 2020 г. Е. М. Бенько<sup>а,\*</sup>, В. В. Лунина<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, Россия

\*e-mail:benko\_elena@mail.ru

Поступила в редакцию 16.03.2019 г.

После доработки 16.03.2019 г.

Принята к публикации 14.05.2019 г.

Изучена эффективность предобработки озоном древесины сосны для последующей ферментации в сахара. Получены кинетические кривые поглощения озона образцами с различным содержанием воды и определены значения оптимальной влажности древесины в процессе озонирования (50–70 мас. %). Установлено, что выход восстанавливающих сахаров в ферментативной реакции растет пропорционально количеству поглощенного озона и достигает максимума при расходе озона около 3 ммоль/г биомассы, что соответствует 2 моль-экв  $O_3/C_9$ ФПЕ лигнина, содержащегося в исходном материале. При продолжительном озонировании выход сахаров падает.

*Ключевые слова:* озон, древесина, сосна, предобработка, ферментативный гидролиз, сахара

DOI: 10.31857/S0044453720010033

Использование древесных лигноцеллюлозных отходов в качестве ресурса для вторичной переработки биомассы в топливо, кормовые и пищевые продукты, и полуфабрикаты химической и микробиологической промышленности является актуальной проблемой. Преобразование возобновляемой растительной биомассы в биотопливо второго поколения (в основном этанола и биогаза, а также бутанола и биоводорода) можно осуществить в мягких и экологически безопасных условиях путем ферментативного гидролиза входящих в ее состав полисахаридов до мономерных сахаров и последующего сбраживания гидролизата. Основная проблема заключается в необходимости предварительной обработки лигноцеллюлозного сырья с целью повышения доступности целлюлозы и гемицеллюлоз, экранированных лигнином в лигноцеллюлозном полимерном композите. Удаление лигнина с помощью озона имеет существенные преимущества перед другими методами делигнификации. Главными из них являются высокая окислительная способность озона в отношении ароматических соединений (в том числе, лигнина) и экологическая безопасность процесса (не образуются побочных токсичных продуктов, остаточный озон легко разлагается на катализаторах до кислорода).

Озонолитической делигнификации растительной биомассы посвящено много работ. Основные достижения в этой области отражены в обзоре [1]. Однако, несмотря на обширный эксперименталь-

ный материал, он представляет собой данные и факты, не связанные единой концепцией.

Целью наших исследований является выявление количественных закономерностей и соотношений физико-химических параметров озонной предобработки, характерных для широкого круга лигноцеллюлозных материалов. Такой подход позволит выяснить механизм озонирования, даст научное обоснование полученным результатам и обеспечит необходимую базу данных для разработки рекомендаций по оптимизации процесса.

В наших предыдущих работах исследована озонная предобработка твердой древесины (осины) [2] и однолетнего растения (соломы пшеницы) [3].

Проведено изучение влияния содержания воды в биомассе на эффективность озонирования. Установлено, что значения оптимального содержания воды, позволяющие реализовать максимальную скорость поглощения озона и свести к минимуму долю непрореагировавшего озона, находятся вблизи 2 ТНВ (точка насыщения волокна) [4].

Другим важным вопросом оптимизации процесса озонной предобработки является установление понятных с точки зрения механизма процесса корреляций между расходом озона, количеством удаленного лигнина и выходом сахаров в ферментативной реакции. В предыдущих работах показано значительное увеличение степени конверсии древесных осиновых опилок [2] и пшеничной соломы [3] после озонирования и установлена зависимость выхода восстанавливающих

сахаров от количества поглощенного озона. На основании полученных результатов сделано предположение о том, что на начальном этапе обработки лигноцеллюлозных композитов озон расходуется преимущественно на реакцию с лигнином. Получены данные об оптимальной дозе озона в процессе обработки, равной 2–3 моль  $O_3/C_9$ -ФПЕ содержащегося в растительном материале лигнина.

Задачей настоящей работы является сравнительное изучение озонирования и последующего ферментативного гидролиза до моносахаридов образцов мягкой древесины сосны. На основании полученных данных могут быть сделаны выводы об общих закономерностях и особенностях озонной предобработки растительной биомассы разной природы.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Образцы сосновых опилок (*Pinus sylvestris L.*) предоставлены и охарактеризованы Алтайским государственным университетом (Барнаул). Содержание основных компонентов: лигнин – 27%, целлюлоза – 49%, гемицеллюлозы – 24%. Размер частиц: фракция 0.6–1.0 мм.

Для приготовления образцов различной влажности навеску воздушно-сухого субстрата пропитывали определенным количеством дистиллированной воды и выдерживали в закрытой емкости в течение нескольких суток. Содержание воды определяли путем взвешивания. Абсолютную влажность образца ( $W$ ) находили как отношение массы воды к массе абсолютно сухой древесины (АСД).

Озонирование проводили в проточном реакторе с неподвижным слоем при комнатной температуре, начальной концентрации озона ~60 мг/л, скорости газового потока 10 л/ч. Озон получали из воздуха в лабораторном озонаторе. Концентрацию озона в газе на входе и выходе из реактора определяли спектрофотометрически с помощью анализатора озона “Медозон 254/3”.

Расход озона в реакции рассчитывали по формуле:

$$a = \frac{w}{m} \int_0^t (c_0 - c_t) dt,$$

где  $t$  – время озонирования;  $m$  – масса образца в расчете на абсолютно сухую древесину (АСД);  $w$  – объемная скорость газового потока,  $c_0$  и  $c_t$  – концентрация озона на входе и выходе из реактора. По начальному участку зависимости удельного расхода озона от времени, определяли начальные скорости реакции озона с образцами.

После озонирования образцы древесины промывали водой, высушивали при температуре ~100°C до постоянного веса и определения поте-

ри массы образца после озонирования. В водном растворе анализировали содержание восстанавливающих сахаров по методу Шомоди–Нельсона [5].

Для ферментативного гидролиза готовили серию образцов, варьируя время озонирования в условиях начальной влажности древесины  $100 \pm 10\%$ . После озонирования образцы без предварительного промывания высушивали на воздухе и использовали для проведения ферментативной реакции.

Для ферментативного гидролиза применяли коммерческий препарат целлюлазного комплекса *Trichoderma Viride* “Целловиридин Г20Х” (производства Бердского завода биологических препаратов, Россия). Целлюлозолитическая активность препарата – 200 ед/г. Реакцию проводили в 0.1 М Na-ацетатном буфере (pH 5.0), содержащем 0.2 г/л антибиотика (ампициллина). Масса образца составляла 50 мг (АСД), объем реакционной смеси 1.75 мл, концентрация ферментов 0.2 мг/мл, температура 50°C. Содержание восстанавливающих сахаров (ВС) в реакционной смеси определяли по методу Шомоди–Нельсона [5]. Содержание глюкозы анализировали глюкозо-оксидазным методом, используя диагностический набор реактивов “Глюкоза-Агат” ООО “Агат-Мед”.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

#### *Влияние содержания воды на эффективность озонирования*

В качестве критерия для оценки эффективности озонирования выбрана скорость поглощения озона. Ранее на примере ряда лигноцеллюлозных материалов показано, что эта величина определяется содержанием воды в образце и максимальна при абсолютной влажности 60–80% [4].

На рис. 1 приведена зависимость начальной скорости поглощения озона сосновыми опилками от влажности образца. Установлено, что абсолютно сухие образцы и водные суспензии озон практически не поглощают. При переходе от воздушно-сухого образца (7%) к точке насыщения волокна (ТНВ ~ 30%) скорость реакции с озоном возрастает на порядок, затем в довольно широком интервале значений влажности (30–100%) изменяется мало, а затем падает.

Полученные результаты можно объяснить влиянием процессов набухания лигноцеллюлозного материала в воде, приводящего к увеличению внутренней поверхности и доступности поверхностных реакционных центров субстрата, и диффузии озона к поверхностным реакционным группам в порах субстрата, замедляющейся по мере заполнения пор водой. Вода также необходима как реакционная среда, в которой растворяется реагент (озон) и продукты реакции. Более

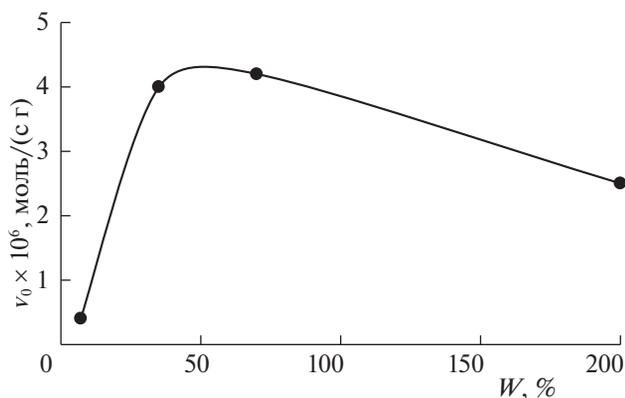


Рис. 1. Зависимость начальной скорости поглощения озона сосновыми опилками от влажности образца.

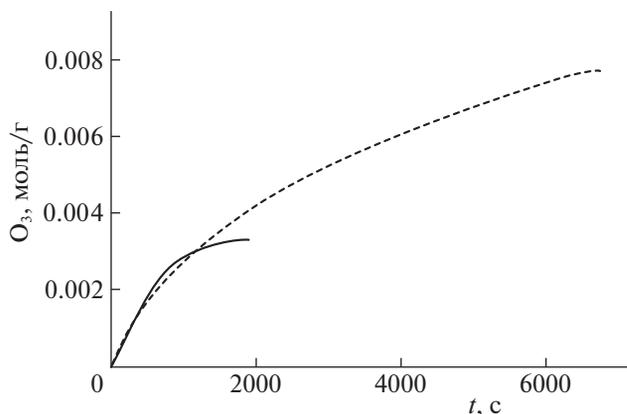


Рис. 2. Кинетические кривые поглощения озона при озонировании сосновых опилок с начальной влажностью 100% (сплошная линия) и 200% (пунктирная линия).

подробно эти вопросы обсуждаются в нашей работе [4].

Таким образом, значения оптимальной влажности древесины сосны, при которой реализуется максимальная скорость реакции с озоном и минимизируется его нецелевой расход, близки к величине 2ТНВ, что аналогично результатам, полученным ранее для твердой древесины осины [2] и пшеничной соломы) [3].

При работе в проточном реакторе в потоке газа со временем влажность образца уменьшается, и когда содержание воды в образце падает до значений  $<7-5\%$  (воздушно-сухой материал), независимо от глубины окислительной деструкции компонентов биомассы, заметное поглощение озона прекращается. Поэтому, чтобы достичь более высоких показателей поглощения озона и степени превращения биомассы, мы берем образцы с более высоким, (чем оптимальное значение) начальным содержанием воды (в наших экспериментах 100%, а для образца с расходом озона  $>7$  ммоль/г 200%). На рис. 2 приведены кинетические кривые поглощения озона при озонировании сосновых опилок с начальной влажностью 100 и 200%.

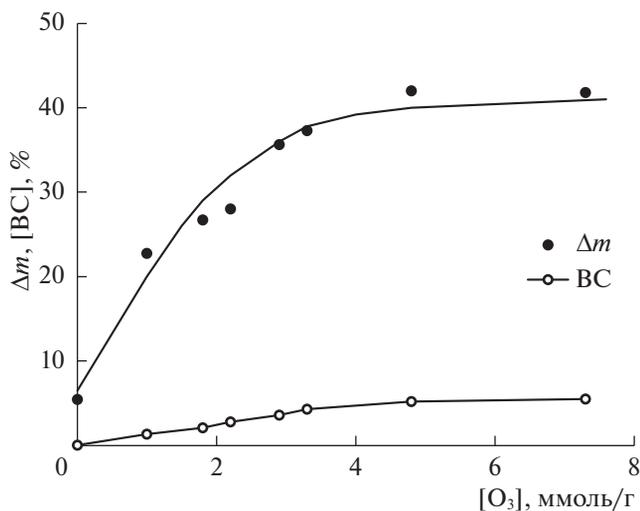
Для решения поставленной в работе конкретной задачи (установить оптимальные дозы поглощаемого биомассой озона) не было важно сохранение постоянного значения влажности на протяжении всего процесса озонирования. Как показано в [6] и установлено нами [7], содержание воды в образце влияет на скорость поглощения озона, а степень делигнификации биомассы и выход сахаров при последующем гидролизе определяется количеством озона, поглощенного в процессе предобработки.

#### Влияние количества поглощенного озона на выход сахаров

Известно, что озонирование растительных лигноцеллюлозных материалов сопровождается окислительной деструкцией лигнина. Основным направлением реакции молекулярного озона с лигнином является озонолиз ароматических структурных субъединиц лигнина [8, 9], в результате чего образуются предельные ( $C_1-C_2$ ) органические кислоты, такие как муравьиная, глиоксальная, щавелевая, уксусная и т.п., которые легко переходят в водный раствор при промывании образца или в ходе ферментативной реакции. Другим результатом озонирования является разрыв эфирных связей, что приводит к деполимеризации лигнина [10]. Возможны также неспецифические радикальные реакции [11].

Рисунок 3 показывает, что после озонирования и последующего промывания водой образец сосны теряет до 40% массы в зависимости от количества поглощенного озона. Количество восстанавливающих сахаров в водорастворимой фракции продуктов не превышает 7%.

Зависимость выхода восстанавливающих сахаров (ВС) и глюкозы (Гл) за 48 ч ферментативного гидролиза от количества поглощенного озона приведена на рис. 4. Обработка озоном заметно повышает реакционную способность растительного субстрата, причем, увеличение количества продуктов реакции происходит пропорционально увеличению расхода озона; — с 40 мг/г ВС для не обработанного озоном образца до 300 мг/г для расхода озона 2.2 ммоль  $O_3$ /г (10 мин озонирования). Однако дальнейшее озонирование (расход озона  $>3$  ммоль/г, время озонирования 20–30 мин) вызывает уменьшение степени конверсии субстрата: при расходе озона 7–8 ммоль/г количество ВС падает в 3 раза до 100 мг/г.



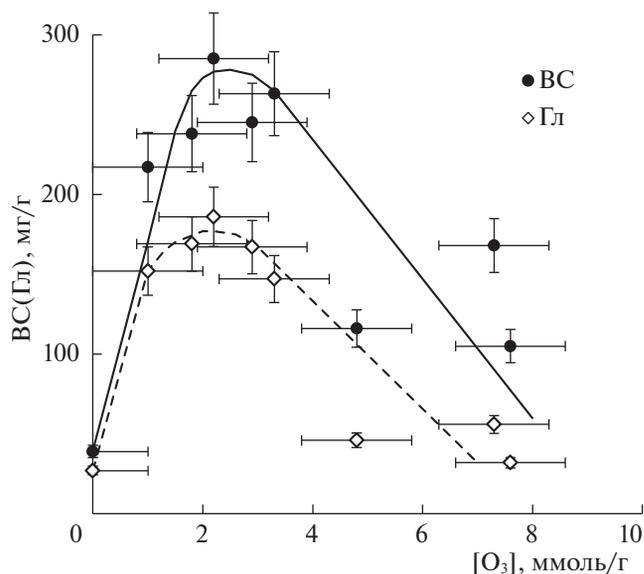
**Рис. 3.** Зависимости потери массы ( $\Delta m$ ) образца сосны после озонирования и промывания водой и количества восстанавливающих сахаров (ВС) в водорастворимых продуктах озонлиза от расхода озона.

Как следует из рис. 5, относительная доля глюкозы в общем количестве сахаров, образовавшихся после ферментативной реакции обработанных озоном образцов сосны до расхода озона  $\sim 3$  ммоль/г имеет постоянное значение, близкое к доле целлюлозы в общем количестве полисахаридов сосны 67% (Ц/(Ц + ГЦ)). При дальнейшем повышении расхода озона относительное содержание глюкозы в продуктах ферментативной реакции уменьшается.

Удаление лигнина и частично связанных с ним гемицеллюлоз делает целлюлозу более доступной для ферментов, и реакция гидролиза протекает быстрее и более глубоко.

Если сравнить положение максимума на зависимости ВС ( $O_3$ ) на рис. 4 и выхода на насыщение зависимости  $\Delta m(O_{3\text{погл.}})$  на рис. 3, то можно видеть, что они совпадают и соответствуют количеству поглощенного озона, близкому к 3 ммоль/г. Можно предположить, что потеря массы образца после озонирования обусловлена, в основном, удалением лигнина (что не противоречит грубой оценке материального баланса). Из этого следует, что область роста реакционной способности озонированных образцов сосны соответствует области удаления из лигноцеллюлозного материала лигнина.

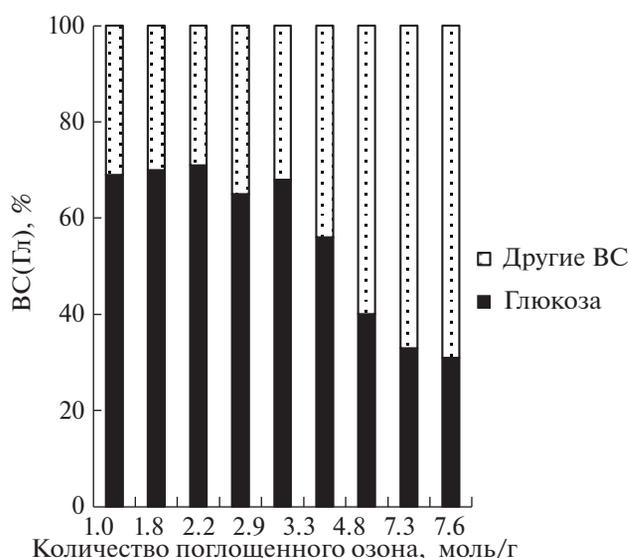
Основываясь на литературных данных [12] и наших данных по озонированию пшеничной соломы [3] и древесины осины [2] можно предположить, что на начальных этапах озон реагирует преимущественно с лигнином. Согласно формуле среднего состава мономерного звена для хвойных лигнинов  $C_9H_{8.5}O_{2.5}(OCH_3)_{0.94}$  [13], молеку-



**Рис. 4.** Зависимости выхода восстанавливающих сахаров (ВС) и глюкозы (Гл) при ферментативном гидролизе образцов древесины сосны от количества озона, поглощенного в процессе предобработки.

лярная масса  $C_9$ -фенилпропановой субъединицы ( $C_9\PhiПЕ$ ) сосны равна  $M_r 190$ . Поскольку в 1 г древесины сосны содержится 0.27 г лигнина, что соответствует 1.4 ммоль/г ароматических субъединиц, то на разрушение ароматики по схеме [8] требуется  $3 \times 1.4 = 4.2$  ммоль  $O_3$ /г АСД.

Экспериментально установленный максимум выхода сахаров при гидролизе образцов сосны, как видно из рис. 4, наблюдается при расходе озона около 3 ммоль/г, что соответствует  $\sim 2$  экв.



**Рис. 5.** Зависимость относительного содержания глюкозы в общем количестве образующихся восстанавливающих сахаров от расхода озона.

O<sub>3</sub>/C<sub>9</sub>ФПЕ и свидетельствует о неполном разрушении лигнина при озонировании.

В наших работах при озонировании осиновых опилок [2] и пшеничной соломы [3] зависимость выхода моносахаридов от количества поглощенного озона имела максимум в области 3 экв. O<sub>3</sub>/C<sub>9</sub>ФПЕ. В работе [14] при озонировании пшеничной соломы максимальный выход сахаров достигался при расходе озона около 2 экв. O<sub>3</sub>/C<sub>9</sub>ФПЕ. Авторами [6] для опилок кедра и кипариса, показано, что количество удаленного лигнина и выход ВС прямо пропорциональны расходу озона вплоть до значений 3 экв. O<sub>3</sub>/C<sub>9</sub>ФПЕ.

Как следует из полученных данных, избыточные дозы озона приводят к тому, что выход продукта в ферментативной реакции снижается. Такой результат для пшеничной соломы получен авторами [14], которые объясняют его ингибирующим действием продуктов окисления лигнина (карбоновых кислот) и гемицеллюлоз (фурановых производных).

Можно указать и другие возможные причины дезактивации озонированных растительных субстратов. Например, при длительной обработке пшеничной соломы озоном наблюдали конденсацию ароматических фрагментов макромолекул лигнина [15, 16], которые могут частично экранировать целлюлозу.

При высокой степени делигнификации повышается вероятность структурного коллапса лигноуглеводной матрицы, приводящего к слипанию целлюлозных волокон и значительному уменьшению доступной для ферментов поверхности субстрата. Такой процесс наблюдался нами при исследовании образцов озонированной пшеничной соломы с помощью СЭМ [17].

При избыточных дозах озона и небольшом содержании остаточного лигнина также увеличивается интенсивность окислительной деструкции целлюлозы. Хотя скорость реакции целлюлозы с молекулярным озоном невелика по сравнению с лигнином [18, 19], она может подвергаться неспецифическому действию радикалов, образующихся при разложении озона. Расщепление гликозидных связей, так называемая, озонолитическая деполимеризация целлюлозы сопровождается раскрытием концевых глюкопиранозных колец [20], что при последующем ферментативном гидролизе снижает выход глюкозы. Окислительная деструкция гемицеллюлоз и аморфной части целлюлозы в озонированной древесине сосны при высоких расходах озона показана в [21].

Таким образом, в результате проведенных исследований определены оптимальные условия озонирования древесины сосны (влажность образца и необходимое количество поглощенного озона), которые обеспечивают минимальный расход озона и максимальный выход сахаров при

гидролизе. Сравнение с полученными ранее данными по озонной предобработке древесных опилок осины и пшеничной соломы позволяет проследить определенные общие закономерности озонной предобработки лигноцеллюлозных материалов, имеющие понятное физико-химическое обоснование. Такой подход дает возможность делать прогнозы относительно оптимальных условий озонирования растительного сырья разного типа.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (код проекта № 16-08-00876) с использованием оборудования, приобретенного из средств Программы развития Московского университета.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Travaini R., Martín-Juárez J., Lorenzo-Hernando A., Bolado-Rodríguez S.* // *Bioresour. Technol.* 2016. V. 199. P. 2.
2. *Ben'ko E.M., Manisova O.R., Lunin V.V.* // *Russ. J. Phys. Chem. A.* 2013. V. 87. P. 1108.
3. *Ben'ko E.M., Chukhchin D.G., Lunin V.V.* // *Ibid.* 2017. V. 91. P. 2092.
4. *Ben'ko E.M., Manisova O.R., Lunin V.V.* // *Ibid.* 2017. V. 91. P. 1117.
5. *Somogyi M.* // *J. Biol Chem.* 1952. V. 200. P. 245.
6. *Sugimoto T., Magara K., Hosoya S. et al.* // *Holzfor-schung.* 2009. V. 63. P. 537.
7. *Ben'ko E.M., Lunin V.V.* // *Khimija Rastitel'nogo Syr'ja* 2019. № 4 (in press).
8. *Bailey P.S.* *Ozonation in Organic Chemistry.* V. II. New York: Acad Press, 1982.
9. *Criegee R.* // *Chem. Int. Ed.* 1975. V. 87. P. 745.
10. *Gierer J.* // *Holzfor-schung.* 1982. V. 36. P. 55.
11. *Ragnar M., Eriksson T., Reitberger T.* // *Holzfor-schung.* 1999. V. 53. P. 292.
12. *Binder A., Pelloni L., Fiechter A.* // *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1980. V. 11. P. 1.
13. *Фенгель Д., Вегенер Г.* *Древесина: химия, ультраструктура, реакции.* М.: Лесная промышленность, 1988. 512 с.
14. *García-Cubero M.T., Palacín L.G., González-Benito G., et al.* // *Bioresour. Technol.* 2012. V. 107. P. 229.
15. *Bule M.V., Gao A.H., Hiscox B., Chen S.* // *J. Agric. Food Chem.* 2013. V. 61. P. 3916.
16. *Kádár Z., Schultz-Jensen N., Jensen J.S. et al.* // *Bio-mass Bioenergy.* 2015. V. 81. P. 26.
17. *Ben'ko E.M., Chukhchin D.G., Lunin V.V.* // *Russ. J. Phys. Chem. A.* 2017. V. 93 (in press).
18. *Hoigne J.* *Hand Book of Ozone Technology and Appli-cations.* Ann. Aiber Science Publisher. M. I. 1982. V. 1.
19. *Nompex P., Dore M.* // *Ozone Sci. Eng.* 1991. V. 13. I. 3. P. 265.
20. *Marq O., Barbe J.M.* // *Res. Chem. Intern.* 1995. V. 21. I. 3–5. P. 205–222
21. *Мамлеева Н.А., Харланов, А. Н., Чухчин Д.Г. и др.* // *Химия раст. сырья.* 2019. № 1. С. 85.