

## БИОКАТАЛИТИЧЕСКАЯ ПРЕДОБРАБОТКА ЛИГНИНСОДЕРЖАЩЕГО СЫРЬЯ

Е.И. Шиманская, О.В. Гребенникова, А.Е. Филатова

Тверской государственный технический университет, г. Тверь

Биокаталитическая деструкция лигнина с применением пероксидазы хрена является экономически выгодным процессом, проходящим при комнатной температуре, при этом позволяющим разбить сложную структуру лигнина на составляющие, которые легче подвергаются процессу гидронолиза. Соответственно, процесс гидронолиза после биокаталитической предобработки потребует меньших временных и энергетических затрат. В статье приведены экспериментальные данные по предобработке лигнина биокаталитическим методом с целью облегчения проведения дальнейшего процесса гидронолиза.

**Ключевые слова:** биокатализ, пероксидаза, лигнин, биотопливо.

В настоящее время проблема техногенного загрязнения окружающей среды органическими отходами производств, которые трудно подвергаются деструкции, является очень важной. Прежде всего, это относится к целлюлозно-бумажной промышленности, в которой используется сульфатцеллюлозная технология переработки древесины [1]. Источниками ее отходов являются отбельный, варочный и кислотный процессы. Преобладающими компонентами стоков целлюлозно-бумажного и гидролизного производства являются лигнинсодержащие соединения, которые попадают со сточными водами в водные объекты, а также накапливаются в виде твердых отходов в многотоннажных количествах. По данным Швейцарского Института Лигнина (International Lignin Institute) в мире в сельскохозяйственных и промышленных целях используется не более 5% промышленных лигнинов, а остальное сжигается в энергетических установках или захоранивается в мусорниках, что составляет около 70 млн т технического лигнина в год. В то же время в отвалах в России находится от 100 до 200 млн т лигнина. Лигнинсодержащие соединения техногенного происхождения служат источником образования токсичных и мутагенных веществ. Была установлена мутагенная активность практически всех видов технических лигнинов. Такой лигнин может самовозгораться с выделением серных, азотных и других соединений, в том числе токсичных, поэтому основной задачей остается интенсификация использования лигнина в сельском хозяйстве и промышленности [2,3]. Установлено, что биологическая активность лигнинсодержащих соединений коррелирует с их

молекулярной массой и общим содержанием кислых групп. Снижение молекулярной массы лигнинсодержащих соединений и увеличение в их составе кислых групп приводит к снижению мутагенных эффектов. Переработка лигносодержащих отходов различными способами с получением практически полезных продуктов позволяет не только существенно уменьшить загрязнение окружающей среды, но и расширить сырьевую базу по производству биологически активных добавок, пищевых продуктов, биотоплив и т.д. [4-6]. Все более широкое распространение получают работы, связанные с изучением биотрансформации и биodeградации лигнина [7]. В настоящее время ведущую роль в окислительной деструкции лигнина отводят ферментам, относящимся к классу оксидоредуктаз, а именно к суперсемейству пероксидаз растений. Наиболее широкое применение благодаря своей высокой каталитической активности в процессе окисления лигнина нашли грибные пероксидазы: LiP, MnP [8], лакказы [9-10] и некоторые растительные пероксидазы – пероксидаза хрена [11]. Особенности строения этих пероксидаз достаточно хорошо изучены, они имеют схожее строение активного центра, однако наиболее широкое применение в процессе окисления лигнина нашли грибные пероксидазы [12]. Что же касается пероксидазы хрена, то ее использование ограничено небольшим кругом исследований в области окисления простых мономерных фенольных структур. Отмеченные факты дают возможность предположить перспективность использования – пероксидазы хрена как катализатора процессов биodeградации лигнина [13]. При этом несмотря на схожесть строения пероксидаз грибного и растительного происхождения, растительные пероксидазы обладают более высокой стабильностью и рН-оптимумом [14]. Следует также отметить, что большинство работ включают изучение процессов на модельных соединениях лигнина, таких, как гваякол, феруловая кислота, ванилиновый спирт, ацетованилон [15]. В данной статье приводятся результаты окисления лигнина пероксидом водорода в присутствии пероксидазы хрена в качестве катализатора.

### **Методы и методики**

#### *Получение пероксидазы хрена.*

Для выделения нативной пероксидазы свежий корень хрена измельчается и в течение 1 ч перемешивается в растворе буфера с рН = 6.8 (10 г на 100 мл) при температуре  $\pm 3$  °С. Затем полученную смесь центрифугируют на центрифуге «Hitachi» при 7000 об/мин в течении 15 мин, после чего центрифугат 2х-кратно фильтруют на фильтре. Полученный экстракт (1000 мл) доводится до 30 % насыщенным  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , при добавлении сухого  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Раствор хранится 24 ч, сформированный осадок удаляется центрифугированием. Супернатантная жидкость доводится до 65 % насыщенным  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

Раствор хранится 24 ч, сформированный осадок удаляется центрифугированием. Оба осадка растворяются в 10 мл воды и высушиваются лиофильной сушкой на установке «LABCONCO». Активность фермента исследовали спектрофотометрически при температуре 20 °С и длине волны 420 нм. Для анализа каждой биологической пробы использовали две одинаковые 1 см кюветы: одна – контрольная, а другая – опытная. В контрольную кювету вносили: буфер фосфата калия (рН 6.0) 2.5 мл, пирогаллол (5.33 %) 0.3 мл, перекись водорода 0.2 мл. В опытную кювету вносили буфер фосфата калия (рН 6.0) 2.4 мл, пирогаллол (5.33 %) 0.3 мл, перекись водорода 0.2 мл, раствор фермента 0.1 мл и одновременно включают секундомер. Затем закрывают кюветную камеру и снимают изменение пропускания. Активность выделенной пероксидазы - 24ЕД активности.

*Окисление лигнина пероксидом водорода.*

Для поддержания требуемого значения рН раствора использовали фосфатный (рН 6,0) буферный раствор. Раствор заданной концентрации пероксида водорода готовили из концентрированного раствора 50% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Точную концентрацию приготовленного раствора пероксида водорода контролировали титриметрическим методом. Процесс окисления проводили в стеклянном реакторе с обратным холодильником при постоянном перемешивании (800 об/мин) и при температуре 313 – 333 К. Растворы с заданной концентрацией вводили в систему в следующей последовательности буферный раствор, раствор пероксидазы хрена, раствора лигнина в 30% ДМСО и раствор пероксида водорода. Общий объем реакционной смеси составил 5 мл. После добавления пероксида водорода раствор перемешивали и фиксировали время начала реакции. В конце реакции отбирали пробу раствора над лигнином и проводили анализ методом ВЭЖХ.

*Анализ реакционной смеси методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.*

В ходе анализа использовали ВЭЖХ установку Ultimate 3000 (Dionex), оборудованную ультрафиолетовым датчиком, масспектрометром – API-2000 (Applied Biosystems), аналитической колонкой Luna C18 (7 мкм) с теоретическим числом тарелок 40000 и размером 150×4 мм. Расход элюента – 0.5 мл/мин при 7 МПа и 30 °С. Детектирование осуществлялось УФ детектором на длине волны 254 нм. Основными продуктами окисления лигнина пероксидом водорода являются: ванилин, ванилиновая кислота, сиреневый альдегид, ацетованиллон, метоксины, гваякол.

## **Результаты и обсуждения**

Перед проведением биокаталитического окисления, лигнин был обработан пероксидом водорода 5% в течение 12 часов. Анализ пробы показал незначительное количество гваякола. Основными продуктами реакции биокаталитического окисления лигнина являются ванилин, ванилиновая кислота, сиреневый альдегид, пирокатехин, гваякол и тетрагваякохинон – продукт взаимодействия гваякола с пероксидом водорода. Все продукты можно условно разделить на три фракции – альдегидная (ванилин, сиреневый альдегид), фенольная (пирокатехин, гваякол и тетрагваякохинон) и кислая (ванилиновая кислота). Выход продуктов рассчитывался от общей суммы продуктов в пробе над лигнином.

С увеличением температуры в интервале 315-335 К выход альдегидной фракции сначала растет, затем постепенно уменьшается с увеличением выхода кислой фракции, что связано с дальнейшим окислением ванилина до ванилиновой кислоты. Выход фенольной фракции постепенно растет с увеличением температуры. Дальнейшее увеличение температуры приводит к деактивации пероксидазы (рис. 1).

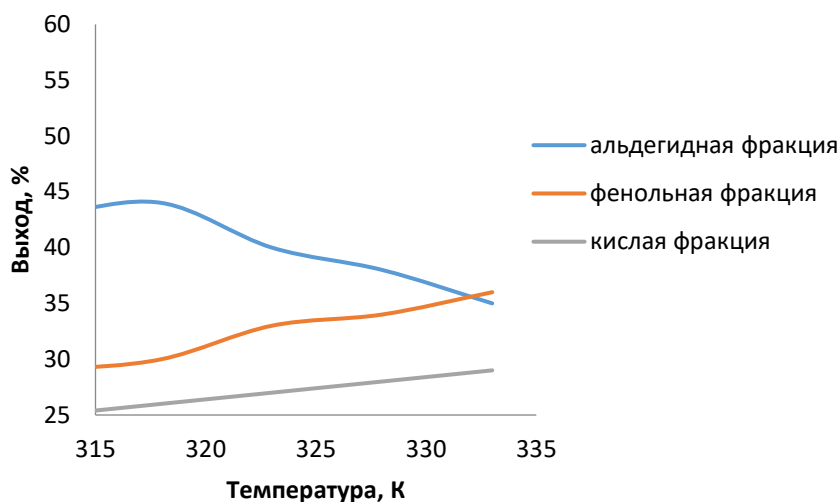


Рис. 1. Зависимость выхода продуктов биокаталитического окисления лигнина от температуры

На рис. 2 представлена зависимость выхода продуктов реакции окисления от времени при температуре 335К. Здесь видно постепенное снижение концентрации ванилина с увеличением концентрации ванилиновой кислоты. Выход остальных продуктов постепенно увеличивается.

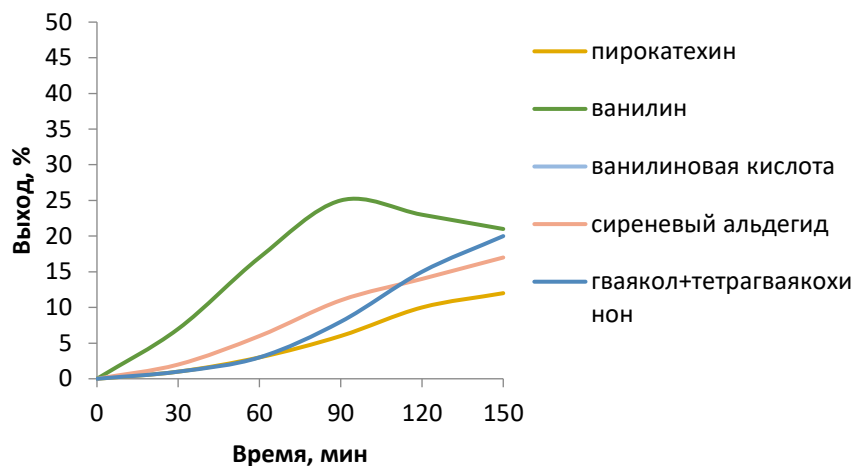


Рис. 2. Зависимость выхода продуктов биокаталитического окисления лигнина от времени

Оптимальной концентрацией пероксида водорода является 5%, так как при этой концентрации достигается максимальный выход фенольной фракции, которая является предпочтительной для дальнейшей переработки в химические вещества, пригодные для использования в качестве биотоплив (Рисунок 3).

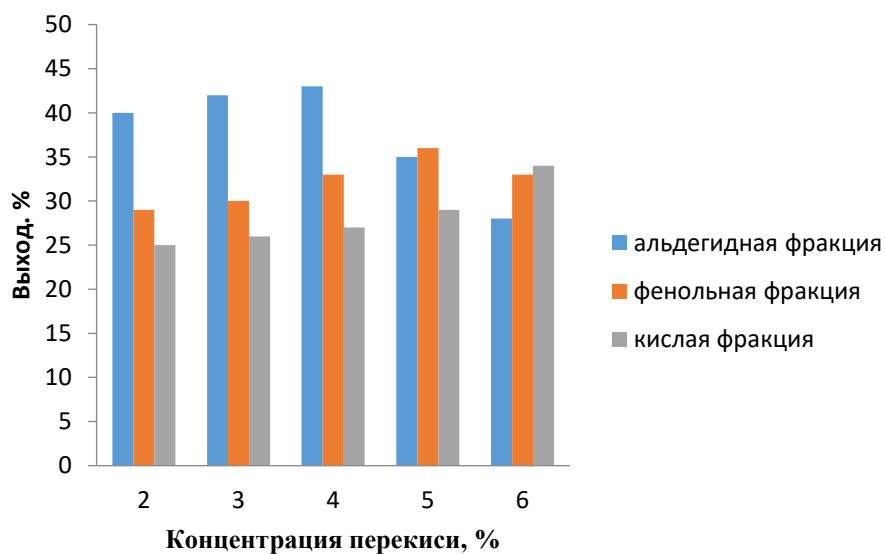


Рис. 3. Зависимость выхода продуктов биокаталитического окисления лигнина от концентрации пероксида водорода

### Заключение

В результате процесса биокаталитического окисления лигнина с использованием пероксидазы хрена были обнаружены следующие продукты: ванилин, ванилиновая кислота, сиреневый альдегид, пирокатехин, гваякол и тетрагваякохинон – продукт взаимодействия гваякола с пероксидом водорода. Оптимальными условиями, при которых образуется наибольшее количество пирокатехина и гваякола (продукты предпочтительные для дальнейшей переработки в масла, используемые в качестве биотоплив) – концентрация пероксида водорода 5%, температура 335 К, время 150 минут.

### Список литературы

1. Haile A., Gelebo G.G., Tesfaye T., Mengie W., Mebrate M.A., Abuhay A., Limeneh D.Y. // *Bioresources and Bioprocessing*. 2021. V. 8. P.35–42.
2. Смирнова В.В. Методы утилизации технических лигнинов // *Сибирь.: СФУ*. 2010., ч.3. С. 340 – 354.
3. Феофилова Е.П., Мысякина И.С. // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2016. Т. 52. № 6. С. 559–569.
4. Арапова О.В., Чистяков А.В., Цодиков М.В., Моисеев И.И. // *Нефтехимия*. 2020. Т. 60, № 3, С. 251–269.
5. Li W., Dou X., Zhu C., Wang J., Chang H., Jameel H., Li X. // *Bioresource Technology*. 2018. V. 269. P. 346–354.
6. Negi, H., Singh, R.K. // *Biomass Conv. Bioref.* 2020. V. 3. P.1–11
7. Kumar A., Chandra R. // *Heliyon*, 2020. V. 6, P.1–18.
8. Lew P. C., Bin Y., Yun J. // *Frontiers in Energy Research. Bioenergy and Biofuels*. 2018. V. 2. Is. 12. P. 1–13
9. Wong D.W. // *Appl Biochem Biotech.* 2009. V. 157. P. 174–209.
10. Fisher A.B., Fong S.S. // *AIMS Bioengineering*. 2017. V. 1. Is. 2. P. 92–112.
11. Azevedo A.M., Martins V.C., Prazeres D.M.F., Vojinovic V., Cabral J.M.S., Fonseca L.P. // *Elsevier science*. 2003. V. 9. P. 199–247.
12. Айзенштадт М.А., Боголицын К.Г., Покрышкин С.А. // *Химия растительного сырья*. 2009. №4. С. 31–37.
13. Покрышкин С.А. Боголицын, К.Г., Хабаров Ю.Г. // *Лесной журнал*. 2013. № 5. С. 177–183.
14. Fujii K., Nakada Y., Umezawa K., Yoshida M., Shibata M., Hayakawa S., Inagaki Y., Kosaki T., Hango R. // *Soil Ecology Letters*. 2020. V.2. P. 281–294.
15. Боголицын К.Г., Айзенштадт М.А., Пряхин А.Н., Лунин В.В., Покрышкин С.А. // *Журнал физической химии*. 2010. Т. 84. № 9. С.1660–1665.

Об авторах:

ШИМАНСКАЯ Елена Игоревна – кандидат химических наук, доцент кафедры Биотехнологии, химии и стандартизации, Тверской государственный технический университет, e-mail: shimanskaya-tstu@yandex.ru

ГРЕБЕННИКОВА Ольга Валентиновна – кандидат химических наук, доцент кафедры Биотехнологии, химии и стандартизации, Тверской государственный технический университет, e-mail: omatveevatstu@mail.ru

ФИЛАТОВА Анастасия Евгеньевна – кандидат химических наук, доцент кафедры Биотехнологии, химии и стандартизации, Тверской государственный технический университет, e-mail: afilatowa@mail.ru

## **BIOCATALYTIC PRETREATMENT OF LIGNIN-CONTAINING RAW MATERIALS**

**E.I. Shimanskaya, O.V. Grebennikova, A.E. Filatova**

Tver State Technical University, Tver

Catalytic destruction of lignin using horseradish peroxidase is an economically advantageous process that takes place at room temperature, while allowing the complex structure of lignin to be broken down into components that are more easily subjected to the process of hydrogenolysis. Accordingly, the process of hydrogenolysis after biocatalytic pretreatment will require less time and energy costs. The article presents experimental data on the pretreatment of lignin by the biocatalytic method in order to facilitate the further hydrogenolysis process.

**Keywords:** *biocatalysis, peroxidase, lignin, biofuels.*