

УДК 543.422:628.3

ПРЕДОБРАБОТКА ОЗОНОМ ЛИГНОЦЕЛЛЮЛОЗНЫХ МАТЕРИАЛОВ: ВЛИЯНИЕ РАСХОДА ОЗОНА НА РЕАКЦИОННУЮ СПОСОБНОСТЬ ПРИ ФЕРМЕНТАТИВНОМ ГИДРОЛИЗЕ В САХАРА

© *Е.М. Бенько**, *В.В. Лунин*

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
ул. Ленинские Горы, 1, Москва, 119991 (Россия), e-mail: benko_elena@mail.ru*

Озонирование как метод предобработки лигноцеллюлозной растительной биомассы для последующей биоконверсии в сахара и спирты в последние годы привлекает большое внимание, что связано с его эффективностью, мягкими условиями эксплуатации и экологической безопасностью. Озон реагирует предпочтительно с лигнином, мало затрагивая полисахариды. Делигнификация способствует высвобождению сахаров в результате ферментативного гидролиза биомассы. Выход сахаров зависит от параметров предварительной обработки, важнейшим из которых является расход озона. Препятствием для практического использования озонной технологии считаются большие затраты озона. Нужны дополнительные исследования для оптимизации процесса с целью экономии озона и достижения высокого выхода целевых продуктов. В работе на примере растительной биомассы разного типа (хвойной и лиственной древесины, соломы) установлены некоторые общие закономерности озонной предобработки для последующей ферментации в сахара. Показано, что реакционная способность обработанных озон растительных субстратов определяется количеством поглощенного озона и практически не зависит от того, при каких условиях озонирования данный расход озона был достигнут. Оптимальный расход озона, позволяющий получить максимальный выход сахаров в ферментативной реакции, равен 2–3 моль О₃/моль С₉ФПЕ лигнина, что при содержании лигнина 25–35% соответствует 10–15 масс.%. Продукты озонирования при таких расходах озона не проявляют ингибирующих свойств.

Ключевые слова: озон, лигноцеллюлозная биомасса, древесина, солома, предобработка, сахара, ингибирование.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 16-08-00876 с использованием оборудования, приобретенного из средств Программы развития Московского университета.

Введение

Благодаря высокой доступности и низкой цене, растительная биомасса является основным потенциальным сырьем для биоконверсии в топливо, продукты химической и микробиологической промышленности. Использовать озонирование, как метод предварительной обработки лигноцеллюлозного сырья с целью повышения его реакционной способности при последующей ферментации в сахара и спирты впервые было предложено в 1980-х годах [1–3]. Однако препятствием для практического применения озонной технологии в то время считалась необходимость использования больших количеств дорогостоящего озона, что делало метод экономически невыгодным. В последние годы, благодаря достижениям в области конструирования и производства озонаторов, приведшим к снижению цен на озон, а также в связи с ужесточением требований по экологической безопасности производств интерес к методу озонной предобработки возрос. Озолиз привлекает своей эффективностью, мягкими условиями эксплуатации и экологической безопасностью [4].

Установлено, что озон реагирует предпочтительно с лигнином, способствуя деструкции лигноцеллюлозного материала и его делигнификации, тем самым облегчая высвобождение сахаров при гидролизе растительного сырья целлюлолитическими ферментами [2, 4]. Показано, что на эффективность озонной предобработки влияют такие параметры как тип биомассы, влажность образца, размер частиц, концентрация озона, скорость газового потока, pH, конструкции реактора [2, 4].

Бенько Елена Михайловна – кандидат химических наук, доцент, старший научный сотрудник,
e-mail: benko_elena@mail.ru
Лунин Валерий Васильевич – академик РАН, профессор,
e-mail: vvlunin@kge.msu.ru

добработки влияют такие параметры как тип биомассы, влажность образца, размер частиц, концентрация озона, скорость газового потока, pH, конструкции реактора [2, 4].

* Автор, с которым следует вести переписку.

Однако из-за сложности растительных лигноцеллюлозных материалов как объектов исследования (непостоянный состав, нерегулярное строение лигнина и гемицеллюлозы, различия в структурной организации и т.д.) полученные экспериментальные данные трудно интерпретировать и обобщить в рамках строгих физико-химических понятий. Представленный в литературе материал в основном носит характер наблюдений и фактов. Это не дает возможности оптимизировать процессы озонной делигнификации.

До сих пор остается нерешенным вопрос об оптимальных условиях озонирования, позволяющих сократить нецелевой расход озона и увеличить выход сахаров при последующем ферментативном гидролизе предобработанных озонем лигноцеллюлозных субстратов. Для его решения требуются дополнительные исследования, направленные на понимание физико-химических закономерностей озонирования растительной биомассы, определение и разделение роли рабочих параметров процесса.

Считается, что наиболее значимыми параметрами процесса озонирования является содержание воды в образце и доза озона [4].

В предыдущей работе проведено изучение влияния содержания воды в биомассе на эффективность озонирования [5]. Установлено, что содержание воды в образце является ключевым фактором, определяющим скорость поглощения озона. Значения оптимального содержания воды, позволяющие реализовать максимальную скорость поглощения озона и свести к минимуму долю непрореагировавшего озона, находятся вблизи значений $2T_{НВ}$ (точка насыщения волокна). Подобные результаты можно объяснить влиянием двух 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. Показано, что вода необходима не только для формирования структуры лигноцеллюлозного материала, но и для создания среды, обеспечивающей транспорт реагента и продуктов реакции. Поскольку значения $T_{НВ}$ для растительной биомассы различного типа близки – для древесины в среднем 30%, для однолетних культур – 40%, то можно предположить, что оптимальная влажность при озонировании любых видов растительных материалов должна составлять $W_{абс.}$ 60–80%.

Многочисленные экспериментальные данные позволяют предположить, что влажность образца влияет на скорость реакции биомассы с озонем, а количество удаленного лигнина и выход сахаров в ферментативной реакции определяется количеством поглощенного озона (расходом озона). Показано [2, 4], что количество удаленного лигнина возрастает с увеличением времени озонирования (расхода озона), а выход сахаров возрастает с увеличением степени делигнификации целлюлозосодержащего субстрата. Однако большинство имеющихся в литературе экспериментальных данных носят качественный характер. В немногих работах расход озона представляют в виде зависимости содержания остаточного лигнина и выхода сахаров от времени озонирования или дозы пропущенного через реактор озона. Если количество поглощенного образцом озона определяют, то его представляют в единицах «г O_3 /г биомассы», что не дает объяснений полученным результатам и не позволяет прогнозировать подходящие условия обработки в других экспериментальных условиях. В литературе практически отсутствуют данные, описывающие зависимость выхода сахаров в ферментативной реакции от расхода озона в широком интервале значений расхода озона.

Настоящая работа посвящена выяснению влияния расхода озона в процессе предобработки на реакционную способность лигноцеллюлозных материалов в реакциях ферментативном гидролизе в сахара. В задачу исследования входит обобщение данных, полученных ранее для биомассы разного типа, и установление объяснимых с точки зрения механизма процесса корреляций между расходом озона и выходом сахаров в ферментативной реакции.

Еще один аспект работы связан с решением вопросов о том, имеет ли значение (с точки зрения выхода сахаров), при каких условиях получен определенный расход озона или важно только абсолютное значение этого параметра, а также какова ингибирующая роль продуктов озонирования в процессах ферментации предобработанной биомассы в сахара. Результаты исследования позволят выявить некоторые общие закономерности процесса озонной предобработки лигноцеллюлозного сырья и определить пути его оптимизации.

Экспериментальная часть

Исследовали опилки лиственной (осина) и хвойной (сосна) древесины, а также образцы однолетнего растения (пшеничной соломы). В таблице приведены характеристики использованных лигноцеллюлозных

материалов: содержание основных компонентов, состав лигнина, средняя молекулярная масса фенилпропановой (ФПЕ) структурной субъединицы лигнина [6], удельное содержание структурных субъединиц в образцах, а также максимальное количество озона, необходимое для деструкции ароматических структур (теоретическая оценка). Размер частиц всех образцов одинаков – фракция 0.6–1.0 мм.

Характеристики лигноцеллюлозных материалов

Образец	Содержание основных компонентов, %			Химический состав лигнина*	M _{гФПЕ} , [6]	Содержание С ₉ ФПЕ, ммоль/г	О ₃ /лг ммоль/г
	Лг	Ц	ГЦ				
Осина обыкновенная (<i>Populus tremula L.</i>)	24	45	26	G-S	210	1.1	3.2
Сосна обыкновенная (<i>Pinus sylvestris L.</i>)	27	49	16	G	190	1.4	4.2
Солома пшеничная (<i>Triticum L.</i>)	20	40	24	H-G-S	196	1.0	3

Примечание. *G – гваяцильные, S – сиренгильные, H – кумаровые структурные единицы.

Перед обработкой озоном образцы биомассы увлажняли, добавляя необходимое количество дистиллированной воды, и выдерживали в закрытой емкости несколько суток. Содержание воды контролировали, взвешивая образец. Влажность образца (W, %) определяли как отношение массы воды к массе абсолютно сухого лигноцеллюлозного материала.

Озонирование проводили при комнатной температуре, начальной концентрации озона ~50–60 мг/л, объемной скорости газового потока 10 л/ч в проточном реакторе с неподвижным слоем. Цилиндрический реактор с диаметром 3.5 и высотой 25 см содержал в нижней части газоотводную трубку с впаянным стеклянным фильтром в качестве рассекателя газовой струи. Масса озонируемого образца составляла 0.3, 0.5 или 1.5 г в расчете на абсолютно сухую биомассу, высота слоя в реакторе не превышала 1–3 см, что позволяло осуществлять равномерную обработку образца, избегая заметного градиента концентрации озона вдоль слоя.

Озон получали из воздуха в лабораторном стеклянном озонаторе в тихом электрическом разряде. Концентрацию озона в газовой смеси на входе и выходе из реактора определяли с помощью спектрофотометра-анализатора озона «Медозон 254/3».

Из кинетических кривых зависимости концентрации озона на выходе из реактора определяли удельное поглощение озона:

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

где w – объемная скорость газового потока, c₀ и c_t – концентрация озона на входе и выходе из реактора, t – время озонирования; m – масса образца в расчете на абсолютно сухую биомассу (АСБ). По линейному начальному участку зависимости удельного расхода озона от времени определяли начальную скорость реакции озона с образцами.

После озонирования образцы промывали водой, высушивали при комнатной температуре до постоянного веса и определяли потерю массы образца после озонирования. В контактном растворе анализировали содержание восстанавливающих сахаров по методу Шомоди-Нельсона [7].

Для ферментативного гидролиза готовили серию образцов, варьируя время озонирования.

После озонирования образцы без предварительного промывания высушивали на воздухе и использовали для проведения ферментативной реакции. В отдельной серии опытов для проведения ферментативной реакции использовали образцы, предварительно промытые водой для удаления продуктов озонирования.

Ферментативный гидролиз осуществляли с помощью коммерческого препарата целлюлозного комплекса *Trichoderma Viride* «Целловиридин Г20Х» (целлюлозолитическая активность 200 ед/г; производитель Бердский завод биологических препаратов, Россия). Реакция протекала при температуре 50 °С в 0.1 М Натриум-ацетатном буфере (рН 5.0), содержащем 0.2 г/л антибиотика (ампициллина). Масса образца составляла 20 мг (АСД), объем реакционной смеси – 1.75 мл, концентрация ферментного препарата – 0.2 мг/мл [8]. Содержание восстанавливающих сахаров (ВС) в реакционной смеси определяли по методу Шомоди-Нельсона [7].

Обсуждение результатов

Расход озона. Известно, что в процессе озонирования лигноцеллюлозных материалов озон как электрофильный агент в первую очередь атакует ароматические структуры лигнина [9]. В качестве основных продуктов озонлиза ароматических субъединиц лигнина образуются низкомолекулярные водорастворимые органические кислоты (муравьиная, глиоксалева, щавелевая, уксусная и др.). Возможны также реакции деполимеризации за счет разрыва эфирных связей [10–12], а также неспецифические радикальные реакции [12].

На рисунке 1 приведены данные, которые показывают, что после озонирования и промывания водой образцы древесины и соломы теряют в зависимости от расхода озона до 35–40% массы. При этом количество восстанавливающих сахаров в водорастворимой фракции продуктов не превышает 5–7%. На основании данных анализа водорастворимых продуктов образцов осины [13] и соломы [14] с помощью метода ВЭЖХ можно предположить, что потеря массы образца после озонирования обусловлена в основном удалением лигнина. Причем на начальном этапе озонирования (расхода озона до 2 ммоль/г) зависимость Δm от расхода озона практически линейна.

Как показано нами в работе [14], при озонировании пшеничной соломы на начальном этапе озонирования (расхода озона до 2 ммоль/г) наблюдается линейное падение содержания лигнина с ростом расхода озона, причем озон расходуется преимущественно на реакцию с лигнином. Этот вопрос подробно рассматривается в нашей предыдущей работе [14]. Заключение о том, что озон почти полностью расходуется на реакцию с неопределенными структурными элементами лигнина, делается на основании анализа зависимости содержания остаточного лигнина от расхода озона, стехиометрических соотношений озона и лигнина, известного механизма реакции ароматических соединений с озоном и кинетических профилей водорастворимых продуктов озонирования, полученных с помощью ВЭЖХ.

На рисунке 2 приведены зависимости выхода восстанавливающих сахаров (ВС) за 48 ч ферментативного гидролиза от количества поглощенного озона. Обработка озоном приводит к значительному повышению реакционной способности растительных субстратов.

Начальная скорость реакции [13] и выход сахаров увеличивается до 10 раз в зависимости от расхода озона. Из данных рисунка 2 следует, что необработанный озоном образец соломы при гидролизе дает 27 мг/г ВС, а озонированный – максимально 412 мг/г. Если учесть, что содержание полисахаридов в соломе равно 64%, то степень конверсии для озонированного образца составляет 64%, а для исходного – 4%.

Необходимо отметить, что в задачу данного исследования не входило получение высокого выхода продуктов. Относительно невысокий выход сахаров можно объяснить неудачным выбором целлюлазного ферментного комплекса. Используемый в работе препарат на основе грибов рода *Trichoderma* отличается несбалансированным составом целлюлазных и гемицеллюлазных комплексов. Недостаток β -глюкозидазы приводит к ингибированию целлобиогидролаз продуктом реакции – целлобиозой, что существенно снижает эффективность гидролиза [15]. В рамках проводимого нами исследования ферментативная реакция использовалась как тестовая, позволяющая установить тенденцию изменения активности субстрата после обработки озоном (области роста, максимума и падения), а также определить, имеются ли общие закономерности озонирования разных видов растительных материалов.

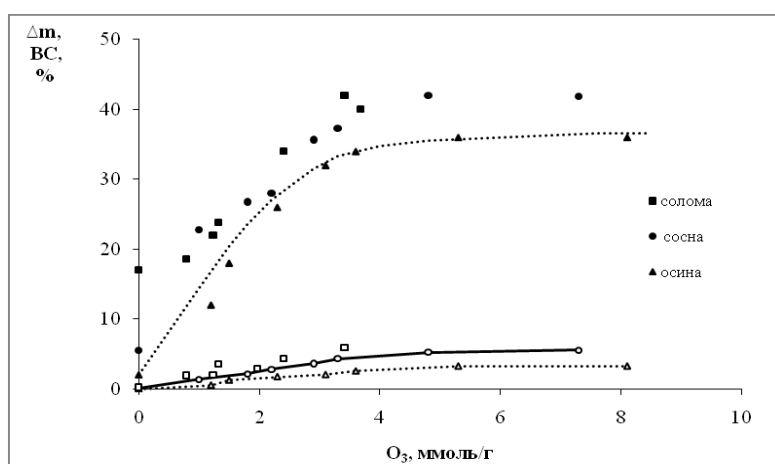
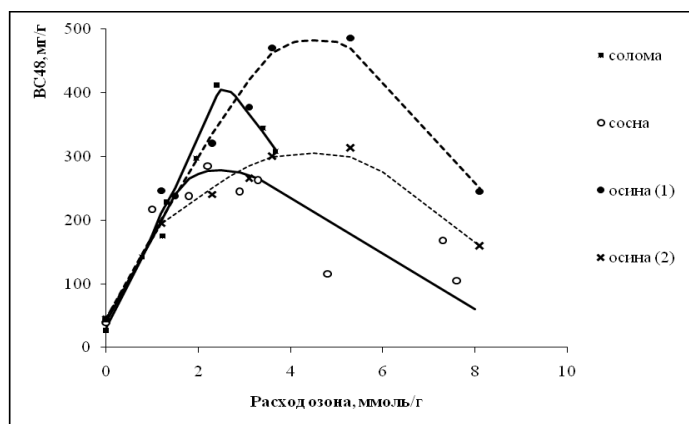


Рис. 1. Зависимость потери массы (Δm) образцов после озонирования и промывания водой и количества восстанавливающих сахаров (ВС) в водорастворимых продуктах озонлиза от расхода озона

Рис. 2. Зависимость выхода восстанавливающих сахаров (ВС) при ферментативном гидролизе образцов биомассы от количества озона, поглощенного в процессе предобработки. Образцы осины промыты водой после озонирования, образцы сосны и соломы использовались без предварительного промывания. Для соломы, сосны и осины (2) выход ВС рассчитан на единицу массы непромытого сухого образца, для осины (1) на единицу массы промытого сухого образца



Полученные результаты показывают, что количество продуктов реакции сначала растет пропорционально увеличению расхода озона. Из сравнения рисунков 1 и 2, а также данных, полученных в [14–17], следует, что область роста реакционной способности озонированных образцов соответствует области удаления из лигноцеллюлозного материала лигнина. Удаление лигнина и частично связанных с ним гемицеллюлоз делает целлюлозу более доступной для ферментов, и реакция гидролиза протекает быстрее и более глубоко.

Для оценки стехиометрических соотношений озона и окисляемых компонентов древесины величину расхода озона удобно пересчитать на фенилпропановую структурную единицу лигнина, содержащегося в биомассе. Известно, что реакции молекулярного озона с лигнином, имеющим ароматическую структуру, протекают в 10^3 – 10^6 раз быстрее, чем с углеводами [18, 19]. Можно предположить, что сначала озон реагирует исключительно с лигнином как наиболее реакционноспособным компонентом растительной биомассы. В случае пшеничной соломы и древесины осины это предположение экспериментально подтверждено в работах [13, 14, 17].

Зная содержание лигнина и молекулярную массу фенилпропановой структурной субъединицы (C_9 ФПЕ), а также принимая во внимание схему озонлиза ароматических соединений [9], по которой на разрушение ароматического кольца расходуется 3 молекулы озона, можно рассчитать содержание ароматических структурных единиц лигнина (ФПЕ, моль/г) и количество озона, необходимое на их деструкцию ($3O_3/C_9$ ФПЕ). Эти величины приведены в таблице.

Несмотря на приблизительность такой оценки, используемый нами подход позволяет выявить некоторые общие закономерности и дать обоснование полученным экспериментальным данным. В литературе обычно выход сахаров рассматривается в зависимости от времени озонирования или дозы пропущенного озона, а если определяют количество прореагировавшего озона, то его выражают в г O_3 на г биомассы. Это затрудняет сравнение данных, полученных разными авторами, и не дает возможности оценить «глубину процесса делигнификации».

Как следует из рисунка 2 и таблицы, максимум выхода сахаров при гидролизе образцов сосны наблюдается при расходе озона около 3 ммоль/г, что соответствует ~ 2 моль O_3 /моль C_9 ФПЕ и свидетельствует о неполном разрушении лигнина при озонировании. При гидролизе образцов пшеничной соломы максимальной конверсии соответствует 2–3 моль O_3 /моль C_9 ФПЕ [19], а для осиновых опилок 3–4 моль O_3 /моль C_9 ФПЕ [13].

Длительное озонирование (расход озона >3 – 4 ммоль/г) вызывает уменьшение степени конверсии субстратов. Аналогичный результат, полученный авторами [20] для пшеничной соломы, объясняется ингибирующим действием продуктов окисления лигнина (карбоновых кислот) и гемицеллюлоз (фурановых производных). Однако для образцов осины, промытых после озонирования, также наблюдается уменьшение выхода ВС.

Другой причиной дезактивации озонированных растительных субстратов может быть так называемый структурный коллапс. При высокой степени делигнификации происходит деструкция лигноуглеводной матрицы, целлюлозные волокна слипаются, что приводит к значительному уменьшению доступной для ферментов поверхности субстрата. С помощью СЭМ этот процесс был визуализирован нами при исследовании образцов озонированной пшеничной соломы с расходом озона >3 моль O_3 /моль C_9 ФПЕ. Полученные результаты и СЭМ-фотографии озонированных образцов подробно обсуждаются в работе [21].

Авторы [22, 23] при длительной обработке биомассы (пшеничной соломы) озоном наблюдали конденсацию ароматических фрагментов макромолекул лигнина, которые могут частично экранировать целлюлозу.

При избыточных дозах озона и небольшом содержании остаточного лигнина также повышается вероятность окислительной деструкции целлюлозы. Хотя скорость реакции целлюлозы с молекулярным озоном невелика по сравнению с лигнином [17, 18], она может подвергаться неспецифическому действию радикалов, образующихся при разложении озона. Происходящее при расщеплении гликозидных связей модифицированию целлюлозы [24] приводит к снижению выхода глюкозы при последующем ферментативном гидролизе. Окислительная деструкция целлюлозы в озонированной древесине осины показана в [25].

Таким образом, использование в процессе предобработки растительного субстрата больших количеств озона, превышающих 3 моль O_3 /моль ФПЕ, приводит к его дезактивации.

Важный вопрос состоит в следующем: имеет значение только величина расхода озона или то, при каких условиях озонирования данный расход озона был достигнут. Таких экспериментальных данных в литературе нет. В работе [26] авторы высказывают предположение, что влажность образца влияет только на скорость поглощения озона, а на степень делигнификации и выход сахаров влияет расход озона. Однако подтверждающих это предположение данных не приводится.

Для выяснения этого вопроса несколько серий образцов были обработаны озоном в разных условиях, а затем исследованы в ферментативной реакции. Образцы отличались исходным содержанием воды ($W_{абс.} 60-200\%$) и массой (0,3, 0,5 и 1,5 г). Кинетические кривые удельного расхода озона для разных серий образцов соломы приведены на рисунке 3.

При одинаковых прочих рабочих параметрах (концентрация озона, скорость газового потока, размер частиц и др.) различия в начальной влажности и массе образцов обуславливают разный режим высыхания образцов в проточной системе в ходе обработки. Это, как показано в [5], заметно отражается на скорости поглощения озона лигноцеллюлозной биомассой. Из приведенных на рисунке 3 данных видно, что для того, чтобы достичь величины расхода озона 1 ммоль/г, образцы с влажностью 100% и массой 0,5, 1,5 и 0,3 г необходимо обрабатывать озоном 5, 20 и 40 мин соответственно. Было установлено, что принципиальной разницы в количестве восстанавливающих сахаров, образующихся при последующем ферментативном гидролизе образцов, не наблюдается. Соответствующие данные приведены на рисунке 4 в виде зависимости выхода ВС от расхода озона для разных серий образцов пшеничной соломы.

Таким образом, влажность озонируемой биомассы практически не влияет на выход сахаров при данном расходе озона. В то же время влажность сильно влияет на скорость реакции биомассы с озоном [2–5, 26–28]. Поэтому при выборе условий озонирования растительного сырья целесообразно брать материал с влажностью $W_{абс.} 60-80\%$ (~2ТНВ), что соответствует максимальной скорости поглощения и максимальной степени превращения озона. Поддержание режима озонирования, при котором сохраняется оптимальное значение влажности образца на протяжении всего времени обработки, является отдельной задачей в каждом конкретном случае.

Из рисунка 4 следует, что в области 3–7 ммоль/г выход ВС практически не зависит от расхода озона. По данным нашей работы [14], в этой области уже не происходит разрушения лигнина. Озон расходуется на реакции с промежуточными продуктами озонлиза лигнина (карбоновыми кислотами), возможно, с полисахаридами и др. Степень делигнификации образцов практически не меняется, поэтому не меняется и реакционная способность предобработанных озоном образцов соломы.

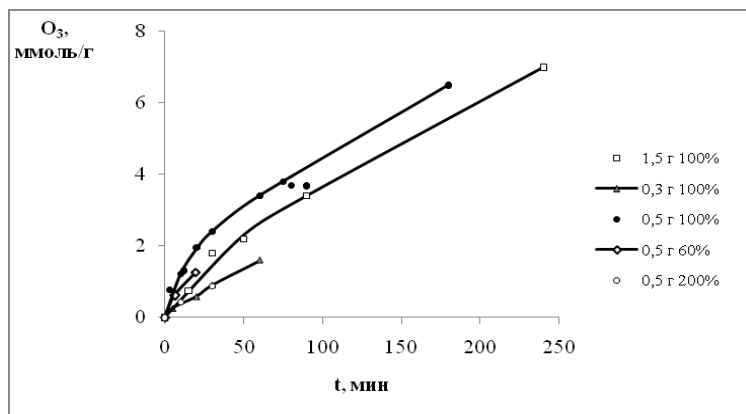
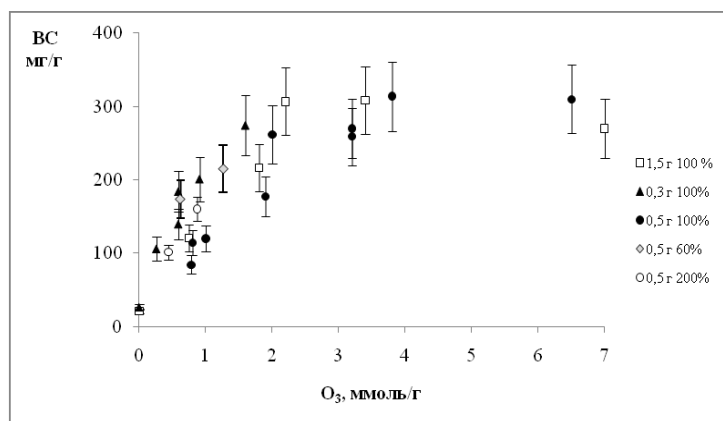


Рис. 3. Кинетические кривые удельного поглощения озона, полученные в процессе озонирования образцов пшеничной соломы в разных условиях

Рис. 4. Зависимости выхода ВС от расхода озона для образцов соломы, озонированных в разных условиях. Образцы промыты водой после озонирования



Падение выхода ВС в области 3–7 ммоль/г для непромытых образцов соломы на рисунке 3 можно объяснить ингибирующим действием продуктов озонирования.

Ингибирующее действие продуктов озонирования. Как следует из данных, приведенных на рисунке 2, большой расход озона в процессе предобработки растительных субстратов вызывает снижение выхода сахаров. Наиболее вероятной причиной этого многие авторы считают ингибирование ферментных и микробных катализаторов продуктами озонирования [20, 29].

В то же время одним из наиболее важных преимуществ окислительной предобработки лигноцеллюлозной биомассы с помощью озона считается отсутствие токсичных промежуточных продуктов-ингибиторов биокаталитических процессов [4]. Такие соединения, как ароматические продукты деструкции лигнина (*n*-гидроксibenзальдегид, ванилин, ванилиновая и капроновая кислоты и др.) и продукты озонолитической окислительной деполимеризации полисахаридов, (фурфурол и его производные), типичные для других методов предобработки, за редким исключением [30] в гидролизатах обнаружены не были. Согласно литературным [4, 31, 32] и нашим [13, 14] экспериментальным данным, основными продуктами озонирования растительных лигноцеллюлозных материалов являются образующиеся при деструкции ароматических структурных субъединиц лигнина низкоцепочечные (C₁-C₂) предельные карбоновые кислоты (глиоксалева, муравьиная, щавелевая и др.). Они не могут рассматриваться в качестве классических ингибиторов ферментов. Более правильно говорить о том, что их присутствие в высоких концентрациях может значительно понижать pH реакционной среды (до pH 2 [13]), а оптимум действия целлюлолитических ферментов лежит в области pH 4–5 [15]. Несмотря на то, что все эти кислоты хорошо растворимы в воде, удаление их из пор такого материала, как растительная биомасса, сопряжено с определенными трудностями, обусловленными капиллярно-пористой структурой лигноцеллюлозного полимерного композита. Необходимо длительное и многократное промывание. На рисунке 4 приведены кривые зависимости выхода ВС от расхода озона для многократно промытых образцов пшеничной соломы.

При решении вопроса о выборе методики подготовки образца к процессам ферментативного гидролиза нужно учитывать следующие обстоятельства. Оптимальные дозы озона в процессе предобработки небольшие (до 2 моль O₃/моль ФПЕ), и при этих условиях концентрация продуктов озонлиза лигнина (карбоновых кислот) относительно невелика и они не оказывают существенного влияния на ферментативную реакцию при использовании буфера. Промывание сопряжено с потерей части ВС, освобождающихся из гемицеллюлоз в процессе озонирования. Процесс вымывания продуктов озонирования из микропористого субстрата является трудоемким и не дает однозначного результата. Из этого можно заключить, что промывать предобработанные озоном образцы биомассы перед ферментативным гидролизом нецелесообразно.

Выводы

1. Выход сахаров в ферментативной реакции определяется количеством поглощенного озона (расходом озона) и практически не зависит от того, при каких условиях озонирования данный расход озона был достигнут.

2. Оптимальные дозы поглощенного озона для предобработки растительной биомассы, позволяющие получить максимальный выход сахаров в ферментативной реакции, равны 2–3 моль O_3 /моль C_9 ФПЕ содержащегося в исходном материале лигнина. При содержании лигнина в биомассе 25–35% оптимальный расход озона соответствует 10–15 масс.%. (O_3 /ЛЦМ).

3. Продукты озонирования при расходе озона до 2 моль O_3 /моль C_9 ФПЕ не проявляют ингибирующих свойств.

4. Использование в процессе предобработки растительного сырья больших количеств озона, превышающих 3 моль O_3 /моль C_9 ФПЕ, приводит к его дезактивации.

Авторы выражают благодарность сотрудникам Алтайского государственного университета профессору Н.Г. Базарновой и доценту В.И. Маркину за предоставление охарактеризованных образцов растительных материалов.

Список литературы

1. Binder A., Pelloni L., Fiechter A. Delignification of straw with ozone to enhance biodegradability // Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1980. Vol. 11. Pp. 1–5. DOI: 10.1007/BF00514070.
2. Neely W.C. Factors affecting the pretreatment of biomass with gaseous ozone // Biotechnol. Bioeng. 1984. Vol. 26. Pp. 59–65.
3. Vidal P.F., Molinier, J. Ozonolysis of lignin – improvement of in vitro digestibility of poplar sawdust // Biomass. 1988. Vol. 16. Pp. 1–17.
4. Travaini R., Martín-Juárez J., Lorenzo-Hernando A., Bolado-Rodríguez S. Ozonolysis: An advantageous pretreatment for lignocellulosic biomass revisited // Bioresour. Technol. 2016. Vol. 199. Pp. 2–12. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.08.143.
5. Ben'ko E.M., Manisova O.R., Lunin, V.V. Effect of moisture content on the interaction between lignocellulosic materials and ozone // Russ. J. Phys. Chem. A. 2017. Vol. 91. Pp. 1117–1123. DOI: 10.1134/S0036024417070056.
6. Фенгель Д., Вегенер Г. Древесина: химия, ультраструктура, реакции. М.: Лесная промышленность, 1988. 512 с.
7. Somogyi M. Estimation of sugars by colorimetric method // J. Biol. Chem. 1952. Vol. 200. Pp. 200–245.
8. Синицын А.П., Черноглазов В.М., Гусаков А.В. Методы исследования и свойства целлюлолитических ферментов. М., 1990. Т. 25. С. 30–37.
9. Bailey P.S. Ozonation in Organic Chemistry. New York, 1982. Vol. 2. 516 p.
10. Gierer J. The chemistry of delignification. A General Concept // Holzforschung. 1982. Vol. 36. Pp. 55–64. DOI: 10.1515/hfsg.1982.36.1.43.
11. Olkkonen C., Tylli H., Forsskahl I., Fuhrmann A., Hausalo T., Tamminen, T., Hortling B., Janson J. Degradation of model compounds for cellulose and lignocellulosic pulp during ozonation in aqueous solution // Holzforschung. 2000. Vol. 54. Pp. 397–406. DOI: 10.1515/HF.2000.067.
12. Ragnar M., Eriksson T., Reitberger T. Radical formation in ozone reactions with lignin and carbohydrate model compounds // Holzforschung. 1999. Vol. 53. Pp. 423–428.
13. Ben'ko E.M., Manisova O.R., Lunin V.V. Effect of ozonation on the reactivity of lignocellulose substrates in enzymatic hydrolyses to sugars // Russ. J. Phys. Chem. A. 2013. Vol. 87(7). Pp. 1108–1113. DOI: 10.1134/S0036024413070091.
14. Ben'ko E.M., Chukhchin D.G., Mamleeva N.A., Kharlanov A.N., Lunin V.V. Ozonolytic delignification of wheat straw // Russ. J. Phys. Chem. A. 2020. (accepted for publication).
15. Ben'ko E.M., Chukhchin D.G., Lunin V.V. Ozone pretreatment and fermentative hydrolysis of wheat straw // Russ. J. Phys. Chem. A. 2017. Vol. 91 (11). Pp. 2092–2097. DOI: 10.1134/S0036024417110036.
16. Mamleeva N.A., Autlov S.A., Bazarnova N.G., Lunin V.V. Delignification of softwood by ozonation // Pure Appl. Chem. 2009. Vol. 81. N11. Pp. 2081–2091. DOI: 10.1351/PAC-CON-08-10-11.
17. Hoigne J. Handbook of ozone technology and Applications. Ann. Aiber Science Publisher. M.I. 1982. Vol. 1.
18. Nompex P., Dore M. Ozonation of selected molecules constituting cellular matter // Ozone Sci. Eng. 1991. Vol. 13. N3. Pp. 265–286. DOI: 10.1080/01919519108552467.
19. García-Cubero M.T., Palacín L.G., González-Benito G., Bolado S., Lucas S., Coca M. An analysis of lignin removal in a fixed bed reactor by reaction of cereal straws with ozone // Bioresour. Technol. 2012. Vol. 107. Pp. 229–234. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.12.010.
20. Ben'ko E.M., Chukhchin D.G., Lunin V.V. Visualization of dynamic changes in wheat Straw cell walls during ozone pretreatment // Russ. J. Phys. Chem. A. 2020. (accepted for publication).
21. Bule M.V., Gao A.H., Hiscox B., Chen S. Structural modification of lignin and characterization of pretreated wheat straw by ozonation // J. Agric. Food Chem. 2013. Vol. 61. N16. Pp. 3916–3925. DOI: 10.1021/jf4001988.
22. Kobayashi M., Asano T., Kajiyama M., Tomita B. Effect of ozone treatment of wood on its liquefaction // J. Wood Sci. 2005. Vol. 51. N4. Pp. 348–356. DOI: 10.1007/s10086-004-0664-9.
23. Marcq O., Barbe J.M. Reaction pathways of glucose oxidation by ozone under acidic conditions // Carbohydrate Research. 2009. Vol. 344. Pp. 1303–1310. DOI: 10.1016/j.carres.2009.05.012.

24. Мамлеева Н.А., Аутлов С.А., Харланов А.Н., Базарнова Н.Г., Лунин В.В. ИК-спектры поглощения целлюлозы из озонированной древесины // Журнал физической химии. 2015. Т. 89. №8. С. 1298–1304. DOI: 10.7868/S004445371508021X.
25. Sugimoto T., Magara K., Hosoya S., Oosawa S., Shimoda T., Nishibori K. Ozone pretreatment of lignocellulosic materials for ethanol production: improvement of enzymatic susceptibility of softwood // *Holzforschung*. 2009. Vol. 63. Pp. 537–543.
26. Mamleeva N.A., Autlov S.A., Bazarnova N.G., Lunin V.V. Degradation of polysaccharides and lignin in wood ozonation // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2016. Vol. 42. N7. Pp. 694–699.
27. Li C., Wang L., Chen Zh., Li Y., Wang R., Luo X., Cai G., Li Y., Yu Q., Lu J. Ozonolysis pretreatment of maize stover: The interactive effect of sample particle size and moisture on ozonolysis process // *Bioresource Technology*. 2015. Vol. 183. Pp. 240–247. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.01.042.
28. Jönsson L.J., Martin C. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects // *Bioresour. Technol.* 2016. Vol. 199. Pp. 103–112. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.10.009.
29. Schultz-Jensen N., Kádár Z., Thomsen A., Bindslev H., Leipold F. Plasmaassisted pretreatment of wheat straw for ethanol production // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2011. Vol. 165. Pp. 1001–1023. DOI: 10.1007/s12010-011-9316-x.
30. Travaini R., Otero M.D.M., Coca M., Da-Silva R., Bolado S. Sugarcane bagasse ozonolysis pretreatment: effect on enzymatic digestibility and inhibitory compound formation // *Bioresour. Technol.* 2013. Vol. 133. Pp. 332–339. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.01.133.
31. Adarme O.F.H., Baêta B.E.L., Diego Roberto Sousa Lima D.R.S., Gurgel L.V.A., Aquino S.F. Methane and hydrogen production from anaerobic digestion of soluble fraction obtained by sugarcane bagasse ozonation // *Ind. Crops. Products*. 2017. Vol. 109. Pp. 288–299. DOI: 10.1016/j.indcrop.2017.08.040.

Поступила в редакцию 15 марта 2019 г.

После переработки 25 апреля 2019 г.

Принята к публикации 27 мая 2019 г.

Для цитирования: Бенько Е.М., Лунин В.В. Предобработка озонм лигноцеллюлозных материалов: влияние расхода озона на реакционную способность при ферментативном гидролизе в сахара // *Химия растительного сырья*. 2019. №4. С. 305–314. DOI: 10.14258/jcrpm.2019045323.

*Ben'ko E.M.**, *Lunin V.V.* OZONE PRETREATMENT OF LIGNOCELLULOSIC MATERIALS: THE EFFECT OF OZONE CONSUMPTION ON REACTIVITY IN ENZYMATIC HYDROLYSIS INTO SUGAR

Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory, 1, Moscow, 119991 (Russia), e-mail: benko_elen@mail.ru

Ozonolysis, as a lignocellulosic biomass pretreatment for sugars and bioethanol production is becoming widespread in recent years owing to its efficiency and environmental safety. Ozone reacts preferably with lignin than carbohydrates, leading to biomass delignification, and so the sugar release by enzymatic hydrolysis. Sugars yield depends on ozone pretreatment parameters and additional studies are necessary to optimize the process to achieve high yields with economic feasibility.

In this work some general patterns of ozone pretreatment are established, using the samples of plant biomass of various types (straw, soft and hardwood). It is shown that the reactivity of vegetable substrates pretreated with ozone is determined by the amount of ozone consumed and practically does not depend on the conditions under which this value of ozone consumption was achieved. The optimal value of ozone consumption, which allows to obtain the maximum yield of sugars in the enzymatic reaction, is 2–3 eq. O₃/C₉PPU (in terms of phenyl-propane structural unit of lignin, contained in the raw material) or 10–15 wt.%. Intermediate ozonation products do not exhibit inhibitory properties at such ozone consumption.

Keywords: ozone; lignocellulosic biomass; wood; straw; pretreatment; sugars; inhibition.

* Corresponding author.

References

1. Binder A., Pelloni L., Fiechter A. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1980, vol. 11, pp. 1–5, DOI: 10.1007/BF00514070.
2. Neely W.C. *Biotechnol. Bioeng.*, 1984, vol. 26, pp. 59–65.
3. Vidal P.F., Molinier, J. *Biomass*, 1988, vol. 16, pp. 1–17.
4. Travaini R., Martín-Juárez J., Lorenzo-Hernando A., Bolado-Rodríguez S. *Bioresour. Technol.*, 2016, vol. 199, pp. 2–12, DOI: 10.1016/j.biortech.2015.08.143.
5. Ben'ko E.M., Manisova O.R., Lunin, V.V. *J. Phys. Chem. A*, 2017, vol. 91, pp. 1117–1123, DOI: 10.1134/S0036024417070056.
6. Fengel' D., Vegener G. *Drevesina: khimiya, ul'trastruktura, reaktsii*. [Wood: chemistry, ultrastructure, reactions]. Moscow, 1988, 512 p. (in Russ.).
7. Somogyi M. *J. Biol. Chem.*, 1952, vol. 200, pp. 200–245.
8. Sinitsyn A.P., Chernoglazov V.M., Gusakov A.V. *Metody issledovaniya i svoystva tsellyuloliticheskikh fermentov*. [Research methods and properties of cellulolytic enzymes]. Moscow, 1990, vol. 25, pp. 30–37. (in Russ.).
9. Bailey P.S. *Ozonation in Organic Chemistry*. New York, 1982, vol. 2, 516 p.
10. Gierer J. *Holzforchung*, 1982, vol. 36, pp. 55–64, DOI: 10.1515/hfsg.1982.36.1.43.
11. Olkkonen C., Tylli H., Forsskahl I., Fuhrmann A., Hausalo T., Tamminen, T., Hortling B., Janson J. *Holzforchung*, 2000, vol. 54, pp. 397–406, DOI: 10.1515/HF.2000.067.
12. Ragnar M., Eriksson T., Reitberger T. *Holzforchung*, 1999, vol. 53, pp. 423–428.
13. Ben'ko E.M., Manisova O.R., Lunin V.V. *Russ. J. Phys. Chem. A*, 2013, vol. 87(7), pp. 1108–1113, DOI: 10.1134/S0036024413070091.
14. Ben'ko E.M., Chukhchin D.G., Mamleeva N.A., Kharlanov A.N., Lunin V.V. *Russ. J. Phys. Chem. A*, 2020. (accepted for publication).
15. Ben'ko E.M., Chukhchin D.G., Lunin V.V. *Russ. J. Phys. Chem. A*, 2017, vol. 91(11), pp. 2092–2097. DOI: 10.1134/S0036024417110036.
16. Mamleeva N.A., Autlov S.A., Bazarnova N.G., Lunin V.V. *Pure Appl. Chem.*, 2009, vol. 81, no. 11, pp. 2081–2091, DOI: 10.1351/PAC-CON-08-10-11.
17. Hoigne J. *Hand book of ozone technology and Applications*. Ann. Aiber Science Publisher. M.I., 1982, vol.1.
18. Nompex P., Dore M. *Ozone Sci. Eng.*, 1991, vol. 13, no. 3, pp. 265–286, DOI: 10.1080/01919519108552467.
19. García-Cubero M.T., Palacín L.G., González-Benito G., Bolado S., Lucas S., Coca M. *Bioresour. Technol.*, 2012, vol. 107, pp. 229–234, DOI: 10.1016/j.biortech.2011.12.010.
20. Ben'ko E.M., Chukhchin D.G., Lunin V.V. *Russ. J. Phys. Chem. A*, 2020. (accepted for publication).
21. Bule M.V., Gao A.H., Hiscox B., Chen S. *J. Agric. Food Chem.*, 2013, vol. 61, no. 16, pp. 3916–3925, DOI: 10.1021/jf4001988.
22. Kobayashi M., Asano T., Kajiyama M., Tomita B. *J. Wood Sci.*, 2005, vol. 51, no. 4, pp. 348–356, DOI: 10.1007/s10086-004-0664-9.
23. Marcq O., Barbe J.M. *Carbohydrate Research*, 2009, vol. 344, pp. 1303–1310, DOI: 10.1016/j.carres.2009.05.012.
24. Mamleyeva N.A., Autlov S.A., Kharlanov A.N., Bazarnova N.G., Lunin V.V. *Zhurnal fizicheskoy khimii*, 2015, vol. 89, no. 8, pp. 1298–1304, DOI: 10.7868/S004445371508021X. (in Russ.).
25. Sugimoto T., Magara K., Hosoya S., Oosawa S., Shimoda T., Nishibori K. *Holzforchung*, 2009, vol. 63, pp. 537–543.
26. Mamleeva N.A., Autlov S.A., Bazarnova N.G., Lunin V.V. *Russ. J. Bioor. Chem.*, 2016, vol. 42, no. 7, pp. 694–699.
27. Li C., Wang L., Chen Zh., Li Y., Wang R., Luo X., Cai G., Li Y., Yu Q., Lu J. *Bioresource Technology*, 2015, vol. 183, pp. 240–247, DOI: 10.1016/j.biortech.2015.01.042.
28. Jönsson L.J., Martín C. *Bioresour. Technol.*, 2016, vol. 199, pp. 103–112, DOI: 10.1016/j.biortech.2015.10.009.
29. Schultz-Jensen N., Kádár Z., Thomsen A., Bindslev H., Leipold F. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2011, vol. 165, pp. 1001–1023, DOI: 10.1007/s12010-011-9316-x
30. Travaini R., Otero M.D.M., Coca M., Da-Silva R., Bolado S. *Bioresour. Technol.*, 2013, vol. 133, pp. 332–339, DOI: 10.1016/j.biortech.2013.01.133.
31. Adarme O.F.H., Baêta B.E.L., Diego Roberto Sousa Lima D.R.S., Gurgel L.V.A., Aquino S.F. *Ind. Crops. Products*, 2017, vol. 109, pp. 288–299, DOI: 10.1016/j.indcrop.2017.08.040.

Received March 15, 2019

Revised April 25, 2019

Accepted May 27, 2019

For citing: Ben'ko E.M., Lunin V.V. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2019, no. 4, pp. 305–314. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.2019045323.