

Doskonalenie procesów biotechnologicznych stosowanych w produkcji etanolu II generacji z surowców lignocelulozowych*

Magdalena Świątek, Małgorzata Lewandowska, Włodzimierz Bednarski

*Katedra Biotechnologii Żywności
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
ul. Heweliusza 1, 10-718 Olsztyn
e-mail: magdalena.swiatek@uwm.edu.pl*

Słowa kluczowe: bioetanol, lignoceluloza, hydroliza enzymatyczna, fermentacja

Wstęp

W związku z rosnącymi cenami ropy naftowej oraz ograniczonymi zasobami paliw kopalnych wzrasta zainteresowanie alternatywnymi technologiami pozyskiwania nośników energii. Do źródeł energii odnawialnej zalicza się energię słoneczną, wiatrową, geotermalną oraz pochodzącą z biomasy. Ta ostatnia aktualnie pokrywa 12% globalnego zapotrzebowania, co wynika głównie z procesów bezpośredniego spalania roślin energetycznych. Jedną z głównych możliwości związanych z wykorzystaniem tego surowca jest produkcja paliw transportowych, ponieważ 2/3 ropy naftowej jest zużywane właśnie w tym celu. Aktualnie produkowane biopaliwa (bioetanol, biodiesel) stanowią znikomy udział w światowym zużyciu paliw. Według wytycznych Unii Europejskiej, w roku 2010 udział biopaliw powinien sięgnąć 5,75%. Dane szacunkowe wskazują, że dalszy wzrost Narodowego Celu Wskaźnikowego (do 10%) może spowodować przeznaczenie nawet 40% aktualnego arealu ziem uprawnych, stwarzając tym samym zagrożenie wzrostu cen żywności.

* Artykuł przeglądowy opracowano w ramach Programu Strategicznego – Zaawansowane Technologie Pozyskiwania Energii; Zadanie nr 4 „Opracowanie zintegrowanych technologii wytwarzania paliw i energii z biomasy, odpadów rolniczych i innych”. Projekt współfinansowany przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju

Zastosowanie odpadów rolniczych, drzewnych, komunalnych odpadów stałych czy dedykowanych roślin energetycznych do wytwarzania bioetanolu, pozwoliłoby zminimalizować tę zależność. Ponadto łatwa dostępność i obfitość występowania biomasy lignocelulozowej sprawiają, że stanowi ona atrakcyjne źródło energii z powodu niskich kosztów pozyskiwania.

Uzyskanie wysokiej wydajności hydrolizy i fermentacji surowców lignocelulozowych wymaga doboru efektywnej metody ich obróbki wstępnej.

Ważnym zagadnieniem w biokonwersji surowców lignocelulozowych jest dobór kompleksu enzymów i mikroorganizmów fermentacji etanolowej. Wiadomo, że surowce lignocelulozowe, zwłaszcza pochodzenia rolniczego, oprócz celulozy i ligniny zawierają znaczne ilości trudno biodegradowalnych hemiceluloz. Zastosowanie do hydrolizy substratu obok celulaz również enzymów hemicelulolitycznych sprzyja uwalnianiu cukrów prostych i poprawie ekonomiki procesu fermentacji. Z kolei mikroorganizmy stosowane w tym celu powinny być zdolne do wydajnej fermentacji alkoholowej zarówno heksoz (glukoza, galaktoza, fruktoza, mannoza), jak i pentoz (ksyloza, arabinoza) powstałych z rozkładu obu grup polisacharydów.

Doskonalenie hydrolizy enzymatycznej

Zastosowanie hydrolizy enzymatycznej surowców lignocelulozowych jest procesem gwarantującym konwersję celulozy i hemiceluloz do cukrów prostych – heksoz i pentoz, które mogą być przekształcane do etanolu przez różne mikroorganizmy. Enzymy hydrolizujące celulozę można podzielić na trzy główne grupy: endocelulazy (EC 3.2.1.4) katalizujące rozpad przypadkowych wiązań glikozydowych łańcucha celulozowego i egzocelulazy (celobiohydrolazy) (EC 3.2.1.91) odpowiedzialne za oddzielenie cząsteczek celobiozy od redukującego (celobiohydrolaza I) lub nieredukującego (celobiohydrolaza II) końca łańcucha celulozy oraz β -glukozydazę (EC 3.2.1.21) rozkładającą celobiozę do dwóch cząsteczek glukozy. Brak aktywnej β -glukozydazy w środowisku hydrolizy powoduje hamowanie aktywności celulaz wywołane obecnością celobiozy. Optymalne warunki dla działania większości stosowanych celulaz to temperatura ok. 50°C i kwasowość środowiska w przedziale pH 4,0–5,0 [3].

Hemicelulozy, w zależności od podjednostek z których są zbudowane, mogą być rozkładane przez różne enzymy: ksylian obecny w znacznych ilościach w drewnie twardym i roślinach jednorocznych (do 35%) ulega hydrolizie pod wpływem enzymów takich jak endoksyylanaza i β -ksylozydaza, które powodują jego degradację do ksylooligosacharydów, natomiast α -glukuronidaza, α -arabinofuranozydaza i esteraza acetyloksylanu odszczepiają boczne grupy i łańcuchy heteroksylianu, a za hydrolizę glukomannanu odpowiadają β -mannanaza i β -mannozydaza [10, 20].

Duża wydajność uwalnianych cukrów podlegających fermentacji jest kluczowym aspektem przemysłowej produkcji etanolu, jednakże wymagane wysokie dawki enzymów zapewniające uzyskanie korzystnych rezultatów znacznie podnoszą koszt produkcji. Ponadto, aktualnie produkowane handlowe preparaty celulaz przeznaczo-

ne są głównie dla przemysłu papierniczego i spożywczego, w związku z czym nie są dostosowane do wydajnej hydrolizy surowców lignocelulozowych, zwłaszcza z powodu różnego składu wynikającego z procedury ich przygotowania [11].

W wyniku kwasowej obróbki wstępnej znaczna część hemiceluloz ulega hydrolizie i przechodzi do frakcji płynnej, natomiast frakcja stała zawiera głównie celulozę i ligninę, stąd też optymalny skład kompozycji enzymów będzie się różnił od tego, przeznaczonego do hydrolizy substratu lignocelulozowego po alkalicznej obróbce wstępnej, w wyniku której zostaje on pozbawiony głównie ligniny [3]. Zastosowanie (obok celulaz) enzymów rozkładających hemicelulozy pozwala na uzyskanie większej wydajności uwalniania cukrów podlegających fermentacji, jak też na zwiększenie stopnia hydrolizy celulozy (na skutek eliminacji ochronnej roli hemiceluloz) [1, 17]. Udowodnili to Kumar i Wyman [11], którzy określili zwiększenie wydajności uwalniania glukozy i ksylozy w wyniku zastosowania hemicelulaz.

Do liderów w zakresie produkcji enzymów rozkładających składniki kompleksu lignocelulozowego należą Novozymes oraz Danisco-Genencor. Danisco – a dokładniej oddział Genencor – specjalizuje się w opracowaniach i sprzedaży enzymów oraz innowacyjnych rozwiązań dla biorafinerii przemysłowych. Jednym z najnowszych produktów zaproponowanych przez Genencor (wprowadzony 15.02.2010 r.), jest Accellerase® DUET – preparat o zwiększonej aktywności hemicelulaz, bazujący na wprowadzonym wcześniej Accellerase® 1500 (o ulepszonej aktywności β -glukozydazy). Obok możliwości zastosowania nawet 3-krotnie mniejszych dawek preparatu, producent gwarantuje skuteczność jego zastosowania do hydrolizy szerokiej gamy substratów lignocelulozowych, poddanych uprzednio różnym metodom obróbki wstępnej [27].

Preparaty enzymatyczne wprowadzone ostatnio na rynek przez firmę Novozymes to Cellic® CTec2 i Cellic® HTec2. Pierwszy z wymienionych charakteryzuje się zwiększoną aktywnością β -glukozydazy, pozwalając na poprawę wydajności hydrolizy surowców lignocelulozowych w wyniku ograniczenia hamującego wpływu celobiozy. Z kolei Cellic® HTec2 zawiera w swoim składzie obok kompleksu celulaz również hemicelulazę (ksylanazę), co gwarantuje efektywny rozkład obu grup polisacharydów [28, 29].

Szybkość i wydajność konwersji polisacharydów do oligosacharydów i cukrów prostych zależna jest zarówno od składu chemicznego, struktury substratu lignocelulozowego i sposobu jego obróbki wstępnej, jak i od rodzaju oraz dawki zastosowanego preparatu enzymatycznego zapewniającej jednocześnie opłacalność ekonomiczną. Zhang i in. [24] wykazali, że zastosowanie preparatu celulaz (Spezyme CP) w dawce $50 \text{ FPU} \cdot \text{g}^{-1}$ celulozy oraz β -glukozydazy (Novozyme 188) – $60 \text{ CBU} \cdot \text{g}^{-1}$ celulo-

* FPU – ilość enzymu uwalniająca 1 μmol równoważnika glukozy, w wyniku hydrolizy bibuły Whatman No. 1, w czasie 1 minuty.

** CBU – ilość enzymu rozkładająca 1 μmol celobiozy do 2 μmol glukozy, w czasie 1 minuty.

Tabela 1. Wydajność konwersji cukrów w zależności od surowca, jego obróbki wstępnej i warunków hydrolizy enzymatycznej

Substrat	Obróbka wstępna	Preparat enzymatyczny/dawka	Czas hydrolizy [h]	Wydajność uwalniania cukrów* [%]		Źródło
				glukoza	glukoza + ksyloza	
Słoma kukurydziana	Ca(OH) ₂ – 0,5 g · g ⁻¹ biomasy (55°C/4 tyg.)	Celulaza – Spezyme CP – 15 FPU · g ⁻¹ celulozy β-glukozydaza – Novozyme 188 – 40 CBU · g ⁻¹ celulozy	72	91,3	51,8	[6]
Słoma kukurydziana	AFEX** NH ₃ : biomasa – 1:1 (90°C/220 psi/5 min.)	Celulaza – Spezyme CP – 7,5 FPU · g ⁻¹ celulozy β-glukozydaza – Novozyme 188 – 15 CBU · g ⁻¹ celulozy Ksylanaza + β-ksylozydaza – Multifect® Xylanase – 5 g białka ksylanazy · g ⁻¹ białka celulozy	72	~90	~83	[11]
Słoma pszenna	AAGAOP*** 70% wodny roztwór glicerolu – 20 g · g ⁻¹ s.s. (220°C/3h)	Celulaza (<i>Penicillium decumbens</i>) – 44 FPU · g ⁻¹ s.s. β-glukozydaza (<i>P. decumbens</i>) – 16,8 CBU · g ⁻¹ s.s.	48	~90	–	[18]
Słoma pszenna	Kwas siarkowy – 50 mM (170°C/30 min.)	Celulaza – GC220 (Genencor) – 46 FPU · g ⁻¹ s.s.	72	98	~88	[8]
Trzcina pospolita	Na ₂ CO ₃ – 2 g · dm ⁻³ , O ₂ – 12 bar, biomasa – 60 g s.s. · dm ⁻³ (195°C/12 min.)	Celulaza – Celluclast 1.5-L – 25 FPU · g ⁻¹ s.s. β-glukozydaza – Novozyme 188 – 25 CBU · g ⁻¹ s.s.	48	71,8	–	[19]
Łodygi słonecznika	Eksplozja parowa (220°C/5 min.)	Celulaza – Celluclast 1.5-L – 15 FPU · g ⁻¹ substratu β-glukozydaza – Novozyme 188 – 12,6 CBU · g ⁻¹ substratu	96	~50	–	[14]

* Uwzględniając początkowy skład surowca przed obróbką wstępną, a także straty cukrów po obróbce, jeśli prowadzono rozdzielanie frakcji;
 ** Ammonia Fibre Explosion – traktowanie biomasy amoniakiem pod wysokim ciśnieniem;
 *** Atmospheric Aqueous Glycerol Autocatalytic Organosolv Pretreatment.

zy, pozwala na osiągnięcie maksymalnej wydajności 24-godzinnej hydrolizy enzymatycznej obu grup polisacharydów, po zwiększeniu zaś tej dawki nie obserwuje się istotnych zmian wydajności procesu.

Na wydajność hydrolizy substratów lignocelulozowych znaczny wpływ mają obecne w materiale produkty degradacji ligniny i polisacharydów, powstające na etapie obróbki wstępnej. Do związków tych zalicza się kwasy takie jak: mrówkowy, octowy i lewulinowy, pochodne furanu – furfural i 5-hydroksymetylofurfural oraz powstające z degradacji ligniny – wanilina i 4-hydroksybenzaldehyd, charakteryzujące się działaniem hamującym aktywność celulaz [5].

W tabeli 1 zamieszczono wyniki opisujące efekty hydrolizy enzymatycznej różnorodnych substratów, poddanych uprzednio obróbce wstępnej.

Doskonalenie procesu fermentacji etanolowej

Proces fermentacji etanolowej produktów degradacji surowców lignocelulozowych może być prowadzony w różnych wariantach technologicznych, przy czym najlepiej poznanym jest SHF (**S**eparate **H**ydrolysis and **F**ermentation) – system z oddzielną hydrolizą i fermentacją. Substrat lignocelulozowy po obróbce wstępnej i hydrolizie, poddawany jest fermentacji, a jego zaletą jest możliwość prowadzenia każdego etapu w najbardziej sprzyjających warunkach temperaturowych (odpowiednio: dla hydrolizy i fermentacji 45–50°C i 30–35°C). Wadą tego systemu jest hamowanie aktywności enzymów hydrolitycznych przez produkty hydrolizy kompleksu lignocelulozowego (zwłaszcza celobiozę), co zmusza do odpowiedniego doboru enzymów oraz ich dawek [15, 16].

Innym wariantem technologicznym jest prowadzenie procesu hydrolizy i fermentacji jednocześnie – SSF (**S**imultaneous **S**accharification and **F**ermentation), gdzie zaletą jest przyswajanie powstających po hydrolizie cukrów przez mikroorganizmy i tym samym zniesienie ich hamującego oddziaływania na aktywność celulaz. Utrudnieniem omawianej metody jest brak możliwości prowadzenia procesu w warunkach temperaturowych korzystnych dla obu reakcji. Rozwiązaniem w takim wariantcie jest zastosowanie termotolerancyjnych, ale mniej wydajnych mikroorganizmów fermentacji etanolowej [15].

Do nowszych technologii jednoczesnej hydrolizy i fermentacji należy NSSF (**N**on-**i**sothermal **S**imultaneous **S**accharification and **F**ermentation) – proces prowadzony w dwóch reaktorach, w różnej temperaturze, z przetłaczaniem medium z jednego reaktora do drugiego. Z kolei proces SSCF (**S**imultaneous **S**accharification and **C**o-**F**ermentation), w którym hydroliza i fermentacja przebiegają w jednym bioreaktorze, wykorzystuje dodatkowo właściwości specjalnie dobranych mikroorganizmów zdolnych do konwersji zarówno heksoz, jak i pentoz. Heksozy są łatwo fermentowane przez drożdże powszechnie stosowane w produkcji etanolu, w przeciwieństwie do pentoz, powstających po hydrolizie hemiceluloz, do których metabolizowania są zdolne tylko

niektóre rodzaje mikroorganizmów. W systemie tym problemem jest wolniejsza asymilacja pentoz i w konsekwencji mniejsza wydajność procesu w odniesieniu do całkowitego stężenia cukrów, wywołana zjawiskiem represji katabolicznej [4, 23].

W odróżnieniu od pochodnych surowców skrobiowych, hydrolizat substratu lignocelulozowego oprócz mieszaniny oligosacharydów, heksoz (glukoza, mannoza, galaktoza) i pentoz (ksyloza, arabinoza), stanowiących substraty do fermentacji, zawiera także związki będące inhibitorami procesu fermentacji, wymienione w poprzednim rozdziale. Mikroorganizmy stosowane w produkcji bioetanolu z surowców lignocelulozowych powinny być więc nie tylko zdolne do konwersji obu grup cukrów do etanolu, lecz również odporne na obecność wspomnianych związków chemicznych. Drożdże *Saccharomyces cerevisiae* stosowane powszechnie w procesie fermentacji etanolowej wykazują odporność na inhibitory obecne w hydrolizatach, jednakże nie są zdolne do fermentacji pentoz, co nie sprzyja wydajności i opłacalności procesu produkcji bioetanolu [5, 12].

Mikroorganizmy zdolne do fermentacji pentoz występują zarówno wśród bakterii, jak i drożdży oraz grzybów strzępkowych. Przeprowadzono szereg badań z zastosowaniem różnorodnych mikroorganizmów, takich jak *Pichia stipitis*, *Clostridium thermocellum*, czy *Klebsiella oxytoca*, naturalnie fermentujących pentozy. Grzyby strzępkowe okazały się odporne na inhibitory, jednakże fermentacja przebiegała zbyt wolno jak na wymagania skali przemysłowej, natomiast aktywność bakterii beztlenowych była hamowana niskim stężeniem cukrów i obecnością etanolu. Drożdże naturalnie fermentujące pentozy (np. *Pichia stipitis* CBS 6054) zapewniające korzystną wydajność procesu, wykazały się wysoką wrażliwością na inhibitory powstające w trakcie obróbki wstępnej i hydrolizy materiałów lignocelulozowych [3].

Georgieva i in. [2] zaproponowali zastosowanie termotolerancyjnych, beztlenowych bakterii *Thermoanaerobacter* BG1L1. Proces prowadzono w reaktorze fluidyzacyjnym ze złożem immobilizowanego biokatalizatora w systemie ciągłym, a substratem był hydrolizat słomy pszennej. Fermentacja z zastosowaniem wymienionych bakterii osiągnęła wydajność $0,39\text{--}0,42\text{ g etanolu} \cdot \text{g}^{-1}$ sumy cukrów – glukozy i ksylozy. Stanowiło to 76–83% teoretycznej wydajności alkoholu, w zależności od początkowego stężenia cukrów w zacierze ($12\text{--}41\text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$). Poziom odfermentowania wyniósł odpowiednio: $4,6\text{--}14,4\text{ g etanolu} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Najnowsze badania zmierzają głównie do otrzymania rekombinantów drożdży lub bakterii, spełniających wymagania stawiane mikroorganizmom wykorzystywanym w produkcji etanolu celulozowego [3]. Modyfikacja mikroorganizmów metodami inżynierii genetycznej obejmuje dwa kierunki badań: jeden z nich dotyczy modyfikacji mikroorganizmów zdolnych do fermentacji etanolowej, tj. *Saccharomyces cerevisiae* czy *Zymomonas mobilis*, pod względem możliwości wykorzystywania pentoz. Drugi opiera się na zmianie ścieżek metabolicznych drobnoustrojów naturalnie wykorzystujących pentozy do wydajnego wytwarzania etanolu. Bakterie *Escherichia coli* stosowane w tych badaniach charakteryzują się dodatkowo znacznie

wyższą odpornością (w porównaniu do *Z. mobilis* i *S. cerevisiae*) na obecne w substratach lignocelulozowych furany i kwasy organiczne [9, 22].

Zastosowanie rekombinowanych szczepów *Saccharomyces cerevisiae*, zdolnych do fermentacji ksylozy pozwala na uzyskanie wysokich wydajności etanolu – od około 70 do ponad 90% wartości teoretycznej. Przykładowo: rekombinowany szczep *Saccharomyces cerevisiae* MA-R4, do którego wprowadzono geny odpowiedzialne za metabolizm ksylozy, pochodzące z *Pichia stipitis*, wydajnie fermentował hydrolyzatu substratu lignocelulozowego uzyskując po 48 h procesu stężenie etanolu na poziomie $39,4 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Wydajność procesu wyniosła $0,48 \text{ g etanolu} \cdot \text{g}^{-1}$ cukrów, co stanowiło 93,2% wartości teoretycznej w odniesieniu do glukozy i ksylozy [13].

Zhao i Xia [26] zaproponowali zastosowanie komórek rekombinowanego szczepu *S. cerevisiae* ZU-10, immobilizowanych w alginianie wapnia, uzyskując z ich udziałem korzystne rezultaty. Po 72 godzinach fermentacji hydrolyzatu słomy kukurydzianej (po uprzedniej obróbce alkalicznej, hydrolizie kwasowej i detoksykacji) osiągnięto stężenie etanolu w wysokości $31,1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ zacieru, przy wydajności procesu na poziomie $0,406 \text{ g etanolu} \cdot \text{g}^{-1}$ cukrów (glukozy i ksylozy). W tym procesie drożdże ZU-10 wykorzystały 100% glukozy i 97,1% ksylozy obecnych w środowisku. Powyżsi autorzy zastosowali wymieniony szczep w procesie SSCF, gdzie po 72 h procesu jednoczesnej hydrolizy i fermentacji hydrolyzatu ze słomy kukurydzianej uzyskali zadowalające wyniki – stężenie etanolu $27,8 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$, przy wydajności $0,35 \text{ g etanolu} \cdot \text{g}^{-1}$ cukrów. W tych warunkach zauważono korzystny wpływ dodatku celobiozy, eliminującej hamujący wpływ celobiozy na proces hydrolizy [25]. Kim i in. [7] do fermentacji etanolowej hydrolyzatu plew jęczmiennych zastosowali rekombinowany szczep *E. coli* ATCC® 55124 (KO11). W procesie prowadzonym w systemie SSCF przez 120 h uzyskano stężenie etanolu $24,1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ zacieru, co stanowiło 89,4% teoretycznej wydajności w przeliczeniu na sumę cukrów obecnych w materiale.

Tsai i in. [21] przeprowadzili natomiast proces specyficznego związania enzymów celulolitycznych (z *Clostridium thermocellum* i *C. cellulolyticum*) na powierzchni komórek drożdży *S. cerevisiae*, dzięki czemu uzyskane biokatalizatory zdolne były do hydrolizy celulozy i fermentacji jej pochodnych z wydajnością rzędu $0,49 \text{ g etanolu} \cdot \text{g}^{-1}$ zasymilowanych cukrów (95% teoretycznej wydajności). W tych warunkach hydrolizie uległo około 70% celulozy obecnej w medium, a stężenie etanolu w zacierze osiągnęło wartość $3,5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Stan zaawansowania przemysłowej produkcji etanolu celulozowego

Korporacja Iogen w 2004 roku rozpoczęła produkcję etanolu z substratów lignocelulozowych w eksperymentalnej fabryce zlokalizowanej w Ottawie (Kanada). Wykorzystuje się w tym celu słomę pszenną (inne możliwe substraty to m.in. słoma kukurydziana, proso różgowe i miskant), która po obróbce wstępnej (steam explosion) poddawana jest wielostopniowej hydrolizie enzymatycznej, a następnie fermentacji.

tacji w systemie SHF. Etanol wydzielany metodą konwencjonalnej destylacji przeznaczony jest do produkcji biopaliw między innymi przez firmę Royal Dutch Stell. Od 2009 roku Iogen stał się pierwszym detalicznym sprzedawcą bioetanolu celulozowego E85 oraz mieszanki E10, które dostępne są w wybranych stacjach paliw w Ottawie [30].

Spółka Celunol (obecnie Verenium) w 2006 roku otworzyła zakład produkcji etanolu celulozowego w skali pilotowej (USA) o rocznej wydajności 190 tys. dm^3 etanolu. Substrat stanowią wyłoki trzciny cukrowej, które po wstępnej hydrolizie kwasowej degradującej hemicelulozy do cukrów prostych i frakcjonowaniu kieruje się do enzymatycznej hydrolizy celulozy. W kolejnym etapie w wyniku niezależnej fermentacji powstałych cukrów prostych – ksylozy i glukozy otrzymuje się etanol [34].

Międzynarodowa korporacja Abengoa Bioenergy w 2007 roku rozpoczęła produkcję etanolu celulozowego w skali pilotowej (York, USA) ze słomy kukurydzianej, która po wstępnej obróbce poddawana jest hydrolizie enzymatycznej i fermentacji (glukozy i ksylozy), z wydajnością produkcji 75 tys. dm^3 etanolu na rok. W 2008 roku otwarty został zakład produkcji etanolu celulozowego w skali demonstracyjnej (Salamanca, Hiszpania) o zdolności produkcyjnej ok. 4,9 mln dm^3 etanolu na rok. Surowcem do produkcji są słomy: pszenna i żytnia, z których po obróbce wstępnej i hydrolizie enzymatycznej frakcja glukozy poddawana jest fermentacji. Korporacja planuje rozpoczęcie w 2012 roku (Hugoton, USA) produkcji etanolu ze słomy pszennej, kukurydzianej i prosa różgowego w ilości 60 mln dm^3 rocznie [33].

Do największych światowych wytwórców etanolu należy przedsiębiorstwo POET. W 26 biorafineriach produkuje z ziarna kukurydzy 227 mln dm^3 etanolu rocznie. W 2009 r. POET uruchomiło zakład produkcji etanolu celulozowego w skali pilotowej (Scotland, USA), gdzie surowcem są odpadowe kolby kukurydzy (corncoobs), a roczna produkcja sięga 75 tys. dm^3 EtOH. W 2012 roku planowane jest rozpoczęcie produkcji etanolu w skali przemysłowej (94,5 mln dm^3 etanolu na rok), przy wykorzystaniu kolb kukurydzy i innych odpadów rolniczych jako surowców [32].

Utworzona w maju 2008 roku przez DuPont i Danisco korporacja DDCE (DuPont Danisco Cellulosic Ethanol) w styczniu 2010 roku uruchomiła w Vonore (Tennessee, USA) biorafinerię eksperymentalnej produkcji bioetanolu z wstępnie degradowanych kolb kukurydzy (przetwarzanie 1–2 tys. ton surowca rocznie), z późniejszym planowanym zastosowaniem prosa różgowego. Korporacja przewiduje uruchomienie do 2013 roku zakładu produkującego bioetanol w skali przemysłowej 113,6–227,3 mln dm^3 na rok, wykorzystującego jako substrat kolby kukurydzy, a w późniejszych latach uruchomienie podobnego zakładu, przetwarzającego proso różgowe. Surowiec po zmieleniu poddawany jest alkalicznej obróbce wstępnej z zastosowaniem amoniaku, w kolejnych etapach hydrolizie enzymatycznej, a następnie fermentacji z wykorzystaniem rekombinowanego szczepu *Zymomonas mobilis*, zdolnego do utylizacji cukrów pięcio- i sześciowęglowych. Planowana wydajność produkcji etanolu celulozowego to $0,32 \text{ dm}^3 \cdot \text{kg}^{-1}$ surowca, przy kosztach produkcji mniejszych od $0,53 \text{ USD} \cdot \text{dm}^{-3}$. W przyszłości przewiduje się zwiększenie wydajności i zmniejszenie kosztów produkcji do $0,39\text{--}0,45 \text{ USD} \cdot \text{dm}^{-3}$ [31].

Podsumowanie

W związku z dostępnością odpadowych surowców lignocelulozowych oraz ciągłym doskonaleniem metod ich przetwarzania etanol II generacji w niedalekiej przyszłości będzie odgrywał istotną rolę na rynku paliw transportowych. Wykorzystanie etanolu celulozowego jako paliwa transportowego wiąże się ponadto z obniżeniem emisji gazu cieplarnianego i pozwala na ograniczenie zależności energetycznej wielu państw.

Prowadzone obecnie badania zmierzają do szczegółowego dopracowania wydajnej i opłacalnej technologii pozyskiwania etanolu, o kosztach produkcji zbliżonych do kosztów otrzymywania go ze skrobi lub cukrów prostych. Konieczny jest dobór najbardziej korzystnych warunków na każdym etapie konwersji kompleksu lignocelulozowego do etanolu, czyli obróbki wstępnej, hydrolizy, fermentacji z uwzględnieniem aspektów ekologicznych i ekonomicznych. Niewątpliwie najważniejszą rolę przypisuje się tutaj mikroorganizmom, gdyż ich aktywność (na etapie pozyskiwania enzymów hydrolitycznych), odporność (na powstające inhibitory) i wszechstronność (zdolność fermentowania pięcio- i sześciowęglowych pochodnych substratu lignocelulozowego) decyduje w największym stopniu o efektywności całego procesu.

W Katedrze Biotechnologii Żywności UWM w Olsztynie prowadzone są badania nad opracowaniem sposobu przetwarzania substratów lignocelulozowych (słoma rzepakowa, kukurydziana) do etanolu. Autorzy pracują nad dostosowaniem parametrów łagodnej obróbki alkalicznej do wybranych substratów i optymalizacją parametrów hydrolizy enzymatycznej, w celu uzyskania korzystnego poziomu degradacji polisacharydów, a następnie wydajnej fermentacji etanolowej.

Literatura

- [1] Benkó Z., Siika-Aho M., Viikari L., Réczey K. 2008. Evaluation of the role of xyloglucanase in the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates. *Enzyme Microb. Technol.* 43: 109–114.
- [2] Georgieva T.I., Mikkelsen M.J., Ahring B.K. 2008. Ethanol production from wet-exploded wheat straw hydrolysate by thermophilic anaerobic bacterium *Thermoanaerobacter* BG1L1 in a continuous immobilized reactor. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 145: 99–110.
- [3] Hahn-Hägerdal B., Galbe M., Gorwa-Grauslund M.F., Lidén G., Zacchi G. 2006. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends Biotechnol.* 12(24): 549–556.
- [4] Hendrik, A.T.W.M., Zeeman G. 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 100: 10–18.
- [5] Jing X., Zhang X., Bao J. 2009. Inhibition performance of lignocellulose degradation products on industrial cellulase enzymes during cellulose hydrolysis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 159: 696–707.
- [6] Kim S., Holtzapfle M.T. 2005. Lime pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover. *Bioresour. Technol.* 96: 1994–2006.
- [7] Kim T.H., Taylor F., Hick S.K.B. 2008. Bioethanol production from barley hull using SAA (soaking in aqueous ammonia) pretreatment. *Bioresour. Technol.* 99: 5694–5702.
- [8] Kootstra A.M.J., Beefink H.H., Scott E.L., Sanders J.P.M. 2009. Comparison of dilute mineral and organic acid pretreatment for enzymatic hydrolysis of wheat. *Biochem. Eng. J.* 46: 126–131.

- [9] Kulikowska D., Klimkowski K. 2008. Produkcja bioetanolu z odpadów lignocelulozowych – możliwości i ograniczenia. Cz. II. Hydroliza i fermentacja. *Gaz, Woda i Technika Sanitarna* 2: 24–28.
- [10] Kumar R., Singh S., Singh O.V. 2008. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35: 377–391.
- [11] Kumar R., Wyman C.E. 2009. Effect of xylanase supplementation of cellulase on digestion of corn stover solids prepared by leading pretreatment technologies. *Bioresour. Technol.* 100: 4203–4213.
- [12] Margeot A., Hahn-Hagerdal B., Edlund M., Slade R., Monot F. 2009. New improvements for lignocellulosic ethanol. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20: 372–380.
- [13] Matsushika A., Inoue H., Murakami K., Takimura O., Sawayama S. 2009. Bioethanol production performance of five recombinant strains of laboratory and industrial xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresour. Technol.* 100: 2392–2398.
- [14] Ruiz E., Cara C., Manzanares P., Ballesteros M., Castro E. 2008. Evaluation of steam explosion pre-treatment for enzymatic hydrolysis of sunflower stalks. *Enzyme Microb. Technol.* 42: 160–166.
- [15] Sainz M.B. 2009. Commercial cellulosic ethanol: The role of plant-expressed enzymes. *In Vitro Cell. Dev. Biol., Plant* 45: 314–329.
- [16] Sánchez Ó.J., Cardona C.A. 2008. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresour. Technol.* 99: 5270–5295.
- [17] Selig M.J., Vinzant T.B., Himmel M.E., Decker S.R. 2009. The effect of lignin removal by alkaline peroxide pretreatment on the susceptibility of corn stover to purified cellulolytic and xylanolytic enzymes. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 155: 397–406.
- [18] Sun F., Chen H. 2008. Enhanced enzymatic hydrolysis of wheat straw by aqueous glycerol pretreatment. *Bioresour. Technol.* 99: 6156–6161.
- [19] Sziárdó N., Kádár Z., Varga E., Thomsen A.B., Costa-Ferreira M., Réczey K. 2009. Pretreatment of reed by wet oxidation and subsequent utilization of the pretreated fibers for ethanol production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 155: 386–396.
- [20] Tokarzewska-Zadora J., Rogalski J., Szczodrak J. 2005. Enzymy rozkładające ksylan – charakterystyka i zastosowanie w biotechnologii. *Biotechnologia* 2(69): 163–182.
- [21] Tsai S.-L., Oh J., Singh S., Chen R., Chen W. 2009. Functional assembly of minicellulosomes on the *Saccharomyces cerevisiae* cell surface for cellulose hydrolysis and ethanol production. *Appl. Environ. Microbiol.* 19(75): 6087–6093.
- [22] U.S. Department of Energy 2006. Breaking the biological barriers to cellulosic ethanol: a joint research agenda. DOE/SC-0095.
- [23] Wyman C.E., Dale B.E., Elander R.T., Holtzapple M., Ladisch M.R., Lee Y.Y. 2005. Comparative sugar recovery data from laboratory scale application of leading pretreatment technologies to corn stover. *Bioresour. Technol.* 96: 2026–2032.
- [24] Zhang M., Su R., Qi W., He Z. 2010. Enhanced enzymatic hydrolysis of lignocellulose by optimizing enzyme complexes. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160: 1407–1414.
- [25] Zhao J., Xia L. 2009. Simultaneous saccharification and fermentation of alkaline-pretreated corn stover to ethanol using a recombinant yeast strain. *Fuel Process. Technol.* 90: 1193–1197.
- [26] Zhao J., Xia L. 2010. Ethanol production from corn stover hemicellulosic hydrolysate using immobilized recombinant yeast cells. *Biochem. Eng. J.* 49: 28–32.
- [27] http://www.genencor.com/wps/wcm/connect/4af75c004166b8008f5e8f2d0f7ba403/Danisco_Genencor_Accellerase_DUET_15022010_en.pdf?MOD=AJPERES&CACHEID=4af75c004166b8008f5e8f2d0f7ba403 (stan z dn. 10.03.2010)
- [28] http://www.bioenergy.novozymes.com/files/documents/Final%20Cellic%20Product%20Brochure_29Jan2010.pdf (stan z dn. 14.03.2010)
- [29] <http://www.novozymes.com/en/MainStructure/PressAndPublications/PressRelease/2010/New+enzymes+turn+waste+into+fuel.htm> (stan z dn. 14.03.2010)
- [30] <http://www.iogen.ca/index.html> (stan z dn. 29.04.2010)
- [31] <http://am1.sosland.com/Olive/ODE/BioFuelsBusiness/Default.aspx?href=BFB/2010/03/01&pageno=1&view=document> (stan z dn. 29.04.2010)
- [32] <http://www.poet.com/index.asp> (stan z dn. 7.07.2010)
- [33] <http://www.abengoabioenergy.com/corp/web/en/index.html> (stan z dn. 7.07.2010)
- [34] <http://www.mass.gov/Eoca/docs/doer/renew/cew110806-celunol-howe.pdf> (stan z dn. 7.07.2010)

The improvement of biotechnological processes applied in production of second generation ethanol from lignocellulosic raw materials

Key words: bioethanol, lignocellulose, enzymatic hydrolysis, fermentation

Summary

Increasing consumption and decreasing supplies of petroleum cause the necessity of searching of alternative energy supports. Abundance and low price of lignocellulosic biomass, especially agricultural residues, cause the lignocellulosic biomass attractive renewable energy source. Production of liquid fuels from lignocellulosic substrates requires defining of efficient and cost-effective technology, which includes conducting of substrates pretreatment, hydrolysis and fermentation. Microorganisms play the most important role because of their activity (production of hydrolytic enzymes), resistance to formed inhibitors and ability to ferment pentoses and hexoses from lignocellulosic substrate decide on technology effectiveness the most.

The examples of improving enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation in lignocellulosic substrate processing towards increase in bioethanol production effectiveness are presented.

