

PREGLEDNI RAD / REVIEW

Usporedba različitih tehnika proizvodnje bioetanola iz lignoceluloznih sirovina

Comparison of different techniques for bioethanol production from lignocellulosic raw materials

T. Rezić^{a*}, M. Ivančić Šantek^a, M. Andlar^a, M. Pavlečić^a, B. Šantek^a

^aZavod za biokemijsko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Pierottijeva 6/IV, HR-10000 Zagreb, Hrvatska

^aDepartment for Biochemical Engineering, Faculty of Food Technology and Biotechnology, Zagreb, Pierottijeva 6/IV, HR-10000 Zagreb, Hrvatska

Sažetak

Bioetanol proizveden iz lignoceluloznih sirovina (npr. ostaci biomase drveta i poljoprivrednih kultura) zadovoljava kriterije ekološke i društveno-političke održivosti. Međutim, troškovi proizvodnje bioetanola iz lignoceluloznih sirovina značajno su veći u odnosu na troškove proizvodnje bioetanola iz šećernih i škrobnih sirovina. Da bi se ostvarila ekonomski održiva proizvodnja bioetanola iz lignoceluloznih sirovina neophodno je razviti i primjeniti nova tehnološka rješenja. Proces proizvodnje bioetanola može se provesti pomoću različitih tehnika vođenja bioprocasa kao što su npr. odvojeni proces hidrolize lignocelulozne sirovine i fermentacija njenog hidrolizata, simulatana hidroliza i fermentacija ili konsolidirani bioproceni sustav. Budući da se tehnika odvojene hidrolize i fermentacije već koristi u industrijskom mjerilu za daljnji razvoj procesa proizvodnje bioetanola iz lignoceluloznih sirovina najveći potencijal ima tehnika simultane hidrolize i fermentacije zbog smanjene mogućnosti pojave inhibicije supstratom (ili drugim sastojcima hidrolizata sirovina) odnosno smanjenja kapitalnih troškova bioprocasa. Kontinuirani postupak vođenja proizvodnje bioetanola dodatno povećava učinkovitost bioprocasa, te smanjuje njegove operativne troškove. Međutim, glavni nedostaci kontinuiranog postupka su povećana mogućnost kontaminacije, nastajanje i nakupljanje nepoželjnih nusproizvoda odnosno povećani kapitalni troškovi bioprocasa. U ovome radu dan je pregled različitih tehnika proizvodnje bioetanola iz lignoceluloznih sirovina, te su ti bioprocasi međusobno uspoređeni na osnovi pokazatelja uspješnosti bioprocasa.

Ključne riječi: bioetanol, lignocelulozne sirovine, predobrada lignoceluloznih sirovina, različite tehnike proizvodnje bioetanola

Abstract

Bioethanol produced from lignocellulosic raw materials (e.g. residuals of wood biomass and agricultural crops) satisfies the ecological and social criteria of sustainable production. However, the costs of bioethanol production from lignocellulosic raw materials are considerably higher than the costs of bioethanol production from sugar and starch containing raw materials. Therefore, it is necessary to use the new technological concepts in order to fulfill the economic sustainability of bioethanol production from lignocellulosic raw materials. Bioethanol production can be performed by different techniques such as for example separate hydrolysis of lignocellulosic raw materials and fermentation of thiers hydrolysates, simlataneous hydrolysis and fermentation or consolidated bioprocessing. Due to the fact that separate hydrolysis and fermentation technique has already industrial application for further development of bioethanol production from lignocellulosic raw materials the highest potential has simultaneous hydrolysis and fermentation technique because of the reduction of substrate (or other constituents of feedstock hydrolysate) inhibition phenomenon and capital costs. Continuous process of bioethanol production additionally increases bioprocess efficiency and reduces its operational costs. However, main disadvantages of continuous process are increased risk of contamination, synthesis and acumulation of non-diserable by-products as well as increased bioprocess capital costs. In this paper, the overview of different techniques for bioethanol production from lignocellulosic raw materials are presented as well as comparison between them was made on the basis of bioprocess efficiency parameters.

Key words: bioethanol, lignocellulosic raw materials, pretreatment of lignocellulosic raw materials, different cultivation techniques for bioethanol production

Uvod

Zamjena goriva proizvedenih iz fosilnih izvora s biogorivima proizvedenim iz obnovljivih izvora prioritet je u mnogim zemljama. Proizvodnja biogoriva iz obnovljivih izvora alternativa je proizvodnji biogoriva iz fosilnih izvora, ali i izazov na ekološkoj, društveno-političkoj i tehnološkoj razini. Ekološka razina vezana je uz povećanu emisiju CO₂ i drugih stakleničkih plinova tijekom proizvodnje i korištenja fosilnih izvora energije. Uz ekološki i društveno-politički, treći razlog poticanja biotehnoške proizvodnje biogoriva je ekonomski, a odnosi se na stvaranje dodatne vrijednosti (ekonomska održivost).

Društveno-politička razina odnosi se na ruralni razvoj i energetska neovisnost, a određena je cijenom, dostupnošću i rasprostranjenošću sirovina koje se koriste u proizvodnji biogoriva. Proizvodnja biogoriva u Europskoj uniji (EU) i Hrvatskoj, određena je strateškim dokumentima EU, "Strategija u proizvodnji i korištenju energije iz obnovljivih izvora" i uredbama Europske komisije (EC) "Inicijativa 20-20-20". Hrvatska mora kao članica EU slijediti, razvijati i podupirati energetske strategije EU. Da bi se ostvarili strateški ciljevi EU potrebno je povećati godišnju proizvodnju biogoriva iz obnovljivih sirovina (biomase) u Hrvatskoj na 260 000 tona do 2030 godine. Hrvatska ima osobito veliki potencijal u proizvodnji energije iz drvne biomase, jer je 62 % kopnenog teritorija pokriveno šumama. Navedeni razlozi poticanja proizvodnje biogoriva uključeni su u tri temeljne pretpostavke održivog razvoja: ekonomski rast, ekološka ravnoteža i društveni napredak (Anonymous 1 2009).

Ovisno o vrsti korištene biomase biogoriva se dijele na: prvu generaciju (biogoriva proizvedena iz biomase bogate šećerom i škrobom), drugu generaciju (biogoriva proizvedena iz lignocelulozne biomase) i treću generaciju (biogoriva dobivena iz biomase mikroorganizama i algi; Nigam i Singh 2011).

Za razliku od biogoriva prve generacije, proizvodnja biogoriva iz lignoceluloznih sirovina ne konkurira proizvodnji hrane i nije uzročnik oscilacije cijena prehrambenih proizvoda. Lignocelulozne sirovine iz šumske, drvne i poljoprivredne proizvodnje su jeftinije sirovine od šećernih i škrobnih sirovina, ali su tehnološki značajno zahtjevnije za proizvodnju biogoriva. Danas se većina biogoriva proizvodi iz šećernih (šećerna trska i repa) i škrobnih (kukuruz) sirovina. Da bi se smanjilo povećanje cijene hrane uzrokovano korištenjem prehrambenih poljoprivrednih kultura za proizvodnju biogoriva najnoviji nalog EC o primjeni biogoriva u transportnom sektoru predviđa smanjenje proizvodnje biogoriva iz tih kultura (npr. kukuruz za 10 % odnosno uljana repica za 5,75%). Nadalje, predviđa se da će bioetanol biti jedno od glavnih goriva u transportnom sektoru zbog netoksičnosti, mogućnosti proizvodnje iz različitih lignoceluloznih sirovina, te primjene u motorima s unutarnjim sagorijevanjem bez potrebe za modifikacijom motora (mješavine fosilnih goriva s 5 ili 10 % etanola). Goriva s većim udjelom bioetanola (do 85 %) koriste se u vozilima s modificiranim motorima tzv. „flexy-fuel“ vozila.

Troškovi proizvodnje bioetanola iz lignoceluloznih sirovina viši su od cijene proizvodnje bioetanola iz šećernih i škrobnih sirovina. Ukupnim troškovima proizvodnje bioetanola iz lignoceluloznih sirovina najviše pridonose cijena i transport sirovina do proizvodnog pogona odnosno troškovi proi-

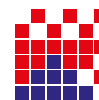
zvodnje enzima za hidrolizu lignoceluloznih sirovina (Gregg i sur. 1998; Wingren i sur. 2003).

Neki od najvažnijih čimbenika smanjenja troškova proizvodnje bioetanola iz lignoceluloznih sirovina su: efikasno korištenje sirovine, veliko iskorištenje bioprocesa, efikasno izdvajanje i pročišćavanje bioetanola te korištenje lignina za proizvodnju toplinske i električne energije (Ogier i sur. 1999; Yu i Zhang 2004; Sanchez i Cardona 2008; Limayem i Ricke 2012).

Uz gore navedene čimbenike biotehnoški rizici proizvodnje bioetanola iz lignoceluloznih sirovina vezani su i uz: dostupnost sirovina [ovisi o potencijalu regije, cijeni i kvaliteti (sastavu) sirovine], mehaničku predobradu sirovina i njihovu enzimsku hidrolizu (treba osigurati relativno veliku koncentraciju fermentabilnih sastojaka tj. 40-100 g L⁻¹) odnosno cijenu enzima primjenjenih za predobradu sirovina (treba biti manja od 5 % proizvodne cijene biogoriva). Nadalje, radni mikroorganizam treba previrati fermentabilne sastojke (heksoze i pentoze) s prinosom etanola koji treba biti što bliže teorijskom prinosu etanola za pojedini fermentabilni sastojak hranjive podloge. Da bi se smanjili kapitalni troškovi vezani uz održavanje aseptičkih uvjeta u bioreктору, potrebno je osigurati i mikrobnu stabilnost, robusnost i prirodnu zaštitu bioprocesa. Za industrijsku primjenu uz navedene kriterije potrebno je zadovoljiti i tehnološke kriterije vezane uz učinkovito vođenje bioprocesa (Olsson i Hahn-Hägerdal 1996; Cardona i Sanchez 2007; Brethauer i Wyman 2010; Mussatto i sur. 2010; Balat 2011; Limayem i Ricke 2012; Zhao i sur. 2012).

Jedna od glavnih zapreka korištenju lignoceluloznih sirovina u proizvodnji bioetanola vezana je i za nepostojanje konkurentne (jeftine) industrijske tehnologije za proizvodnju bioetanola iz lignoceluloznih sirovina. Proizvodnja bioetanola iz lignoceluloznih sirovina provodi se u nekoliko koraka: predobrada, detoksifikacija, hidroliza (saharifikacija), proizvodnja bioetanola (fermentacija) u bioreктору, te proces izdvajanja i pročišćavanja bioetanola (Lynd 1996; Lynd i sur. 2002; Balat 2011; Limayem i Ricke 2012).

Međusobno povezivanje procesa hidrolize (saharifikacije) sirovine i alkoholnog vrenja dobivenog hidrolizata (fermentacija) ostvaruje se u procesu simultane hidrolize i fermentacije (eng. simultaneous saccharification and fermentation, SSF). Tijekom ovog načina vođenja bioprocesa koncentracija supstrata je relativno mala, jer se jednostavni šećeri (heksoze i pentoze) nastali procesom hidrolize odmah troše za rast radnog mikroorganizama i sintezu etanola. Postupak gdje se istovremeno provodi i fermentacija pentozna se još u literaturi naziva i simultana saharifikacija i ko-fermentacija (eng. simultaneous saccharification and co-fermentation SS_{CF}). Zbog male koncentracije jednostavnih šećera ne dolazi do inhibicije supstratom, te se povećava produktivnost bioprocesa. Nadalje, prednost postupka simultane saharifikacije i fermentacije je smanjena mogućnost kontaminacije, smanjenje osmotskog tlaka hranjive podloge i bolja energetska učinkovitost (Bothast i Schlicher 2005; Bai i sur. 2008). Daljnje smanjenje troškova proizvodnje bioetanola iz lignoceluloznih sirovina očekuje se usljed međusobnog povezivanja različitih tehnoloških operacija u integrirani (jedinstven) sustav koji je najuočljiviji kod konsolidiranog bioprocenog sustava (eng. consolidated bioprocessing, CBP) za proizvodnju bioetanola. U tom sustavu biosinteza celulaza, ošećerenje prethodno obrađene lignocelulozne sirovine i alkoholno vrenje (fermentaciju) provodio bi



samo jedan radni mikroorganizam. Ovaj koncept proizvodnje bioetanola je najinteresantiji s ekonomskog stajališta, a glavni nedostatak ovog sustava leži u činjenici da još uvijek nije pronađen zadovoljavajuće učinkovit radni mikroorganizam koji posjeduje sve prethodno navedene osobine. Međusobnim povezivanjem (integriranjem) različitih faza procesa proizvodnje bioetanola smanjuju se kapitalni i energetske troškovi njegove proizvodnje (Lynd i sur. 2005; Cardona i Sanchez 2007; Balat 2011; Limayem i Ricke 2012).

U ovom radu razmatran je postupak pripreme lignoceluloznih sirovina za proizvodnju bioetanola odnosno različite tehnike proizvodnje bioetanola iz lignoceluloznih sirovina.

Priprema lignoceluloznih sirovina za proizvodnju bioetanola

Lignocelulozne sirovine potrebno je na odgovarajući način pripremiti za proizvodnju bioetanola. Priprema sirovina obuhvaća ove tri faze: predobradu (predtretman), hidrolizu i ukoliko je potrebno detoksifikaciju hidrolizata lignoceluloznih sirovina. Jedan od čimbenika koji utječu na izbor metode za pripremu lignocelulozne sirovine je i njezin sastav koji ovisi o vrsti (podrijetlu) sirovine. Lignocelulozne sirovine su građene od ovih osnovnih komponenta: celuloza (36-61 % u s. tv.), hemiceluloza (13-39 % u s. tv.) i lignin (6-29 % u s. tv.). Potrebno je naglasiti da sirovine bogate na pektinu imaju znatno manje lignina, te je njihov sastav određen udjelom pektina. Celuloza je linearni polimer D-glukoza jedinica povezanih β -1,4-glikozidnim vezom pri čemu su prisutne kristalinične i amorfne strukture polimera glukoze. Hemiceluloza je heteropolisaharid sastavljen od pentoznih jedinica monosaharida (ksilozne i arabinoze) i heksoznih jedinica monosaharida (manoze, glukoze i galaktoze). Lignin je polimer sastavljen od tri različite fenilpropanske jedinice (p-kumaril, koniferil i sinapil alkohola), te djeluje kao vezivo između hemiceluloze i celuloze (Hahn-Hägerdal i sur. 2006; Wyman 2007; Taylor 2008; Erdei i sur. 2013).

Predobrada lignoceluloznih sirovina potrebna je kako bi se promjenio sastav i struktura sirovine s ciljem: izdvajanja lignina i modifikacije lignocelulozne strukture, hidrolize hemiceluloze, dekristalizacije celuloze i stvaranja površina dostupnih enzimima. Navedene promjene osiguravaju efikasnu enzimsku hidrolizu u sljedećem koraku, smanjenje energetske troškova za miješanje i izdvajanje proizvoda i relativno brzo alkoholno vrenje bez pojave inhibicije (Olsson i Hahn-Hägerdal 1996). Kao postupci predobrade koriste se odvojeno ili u kombinaciji sljedeći postupci: predobrada parom, organskim otapalima, kiselinama, lužinama, amonijakom, SO_2 , ionskim tekućinama, gama-zrakama ili ultrazvukom. Međutim, neki od navedenih postupaka još uvijek nisu ekonomski isplativi ili tehnički izvedivi u industrijskom mjerilu (Lynd i sur. 2002; Huang i sur. 2008; Wyman i sur. 2009; Balat 2011; Limayem i Ricke 2012).

Zbog povoljne cijene anorganskih kiselina, za proces proizvodnje bioetanola najčešće se primjenjuje postupak predobrade razrijeđenim ili koncentriranim kiselinama (uglavnom H_2SO_4). Postupak predobrade koncentriranim kiselinama provodi se na sobnoj temperaturi pri čemu se hidrolizira do 90 % suhe tvari lignocelulozne sirovine. Međutim, za regeneraciju i

reciklaciju kiseline potrebno je utrošiti relativno veliku količinu energije i vremena (trajanje procesa od 2 do 6 h), a kapitalni troškovi opreme su također visoki (oprema je izložena ubrzanom koroziji zbog djelovanja kiselina). Primjena razrijeđenih kiselina pri višim temperaturama skraćuje vrijeme hidrolize i količinu upotrebljene kiseline. Hemiceluloza je osjetljivija na djelovanje kiselina od celuloze i može se hidrolizirati do 85 % prisutne hemiceluloze u sirovini s razrijeđenim kiselinama pri atmosferskom tlaku i 40 °C. Hidrolizu celuloze potrebno je provoditi pri višim temperaturama da bi se dobili zadovoljavajući prinosi glukoze iako ti uvjeti doprinose stvaranju nepoželjnih produkata hidrolize koji inhibiraju rast radnog mikroorganizma i smanjuju učinkovitost bioprocasa. Vrsta i koncentracija inhibitora ovisi o vrsti lignocelulozne sirovine i postupku hidrolize, a za uspješnu proizvodnju bioetanola, ukoliko je potrebno, izvodi se postupak detoksifikacija tj. uklanjanje inhibitora iz hranjive podloge. Inhibitori rasta radnog mikroorganizma po kemijskom sastavu su fenolni spojevi, alifatske kiseline, furan aldehidi i anorganski ioni. Najzastupljeniji furan aldehidi su furfural (dehidracija pentoza) i 5-hidroksimetil furfural (dehidratacija heksoza) koji nastaju razgradnjom šećera. Razgradnjom lignina nastaju fenolni spojevi od kojih su najzastupljeniji vanilin, dihidrokoniferil alkohol, koniferil-aldehid, hidrokinon, acetogvajakon, homovanilinska kiselina, 4-hidroksibenzojeva kiselina. Razgradnjom polisaharida i njihovih razgradnih produkata tijekom kiselinske hidrolize nastaju npr. octena kiselina deaciliranjem hemiceluloze odnosno mravlja i levulinska kiselina razgradnjom 5-hidroksimetil furfurala (Jönsson i sur. 2013). Kako bi se spriječila razgradnja monosaharida hidroliza se provodi u dva stupnja. U prvom stupnju hidrolizira se hemiceluloza djelovanjem razrijeđenih kiselina pri nižim temperaturama, a u drugom stupnju hidroliza čvrstog ostatka djelovanjem koncentriranih kiselina i viših temperatura. Opisnim postupkom ostvaruje se 90 % hidroliza hemiceluloze i 40 % - 60 % hidroliza celuloze. U cijevnom bioreaktoru s čepolikim strujanjem vrijeme zadržavanja iznosilo je 30 sekunda pri 210 °C te je ostvarena 60 % hidroliza celuloze. Da bi se povećao stupanj hidrolize celuloze, razvijeni su bioreaktori s nasutim i fluidiziranim slojem pri čemu se stupanj hidrolize celuloze povećao na 90 % kod 235 °C (Taherzadeh i Karimi 2007).

Nakon predobrade, s ciljem oslobađanja fermentabilnih šećera iz celuloze i hemiceluloze, najčešće se koristi enzimsku hidrolizu. Celulolitički (celulaze) enzimi koriste se za hidrolizu celuloze, a hemicelulaze (ili glikozilhidrolaze) za hidrolizu hemiceluloze. Hidroliza celuloze se najčešće provodi korištenjem celulolitičkih enzima iz funga *Trichoderma reesei* na sobnoj temperaturi (Hendriks i Zeeman 2009).

Uz *T. reesei* neki od proizvodnih organizama (sintetiziraju endo- i egzo- celulolitičke enzime) su bakterije iz rodova: *Clostridium*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Acetovibrio*, te fungi iz rodova: *Trichoderma*, *Scyrelodium*, *Fusarium*, *Neurospora*. Stupanj hidrolize predobrađene sirovine povećava se s povećanjem koncentracije primjenjenih celulolitičkih enzima, ali istovremeno se i značajno povećavaju troškovi bioprocasa. Zbog toga je potrebno ovisno o vrsti sirovine i aktivnosti enzimskog pripravka (komercijalni enzimi na tržištu smjesa su različitih celulolitičkih i hemicelulolitičkih enzima) točno odrediti koncentraciju enzima za uspješnu hidrolizu lignocelulozne sirovine (npr. za hidrolizu 1 g celuloze potrebno je 5 - 60 FPU celu-

laza; FPU je koncentracija enzima koja oslobađa 1 μM glukoze iz Whatman No. 1 filter papira u minuti pri pH 5,0 i 50 °C). Osim optimalne temperature i pH potrebno je osigurati i efikasnu distribuciju enzima do sirovine. Zbog osobina hidrolizata lignoceluloznih sirovina (polučvrsti ili čvrsti supstrat) dolazi do usporavanja ili blokiranja distribucije odnosno djelovanja enzima na supstrat usljed vezanja enzima na nespecifična mjesta, te gubitka enzimske aktivnosti. Uzroci gubitka enzimske aktivnosti mogu biti i denaturacija zbog djelovanja sila smicanja usljed miješanja ili neadekvatne kontrole parametara bioprocasa. Ukoliko se koriste proteolitički enzimi potrebno ih je deaktivirati, odnosno spriječiti njihovo negativno djelovanje na celulaze (Wyman i sur. 2004; Zhao i sur. 2012). Da bi se povećao udjel fermentabilnih šećera prije procesa alkoholnog vrenja, može se koristiti i vakuum uparavanje kao dio postupka pripreme lignoceluloznih sirovina za proizvodnju bioetanola. Negativne posljedice postupka vakuum uparavanja su dodatan utrošak energije i koncentriranje inhibitora alkoholnog vrenja, ali i smanjenje troškova za izdvajanje etanola (Taherzadeh i Karimi 2007).

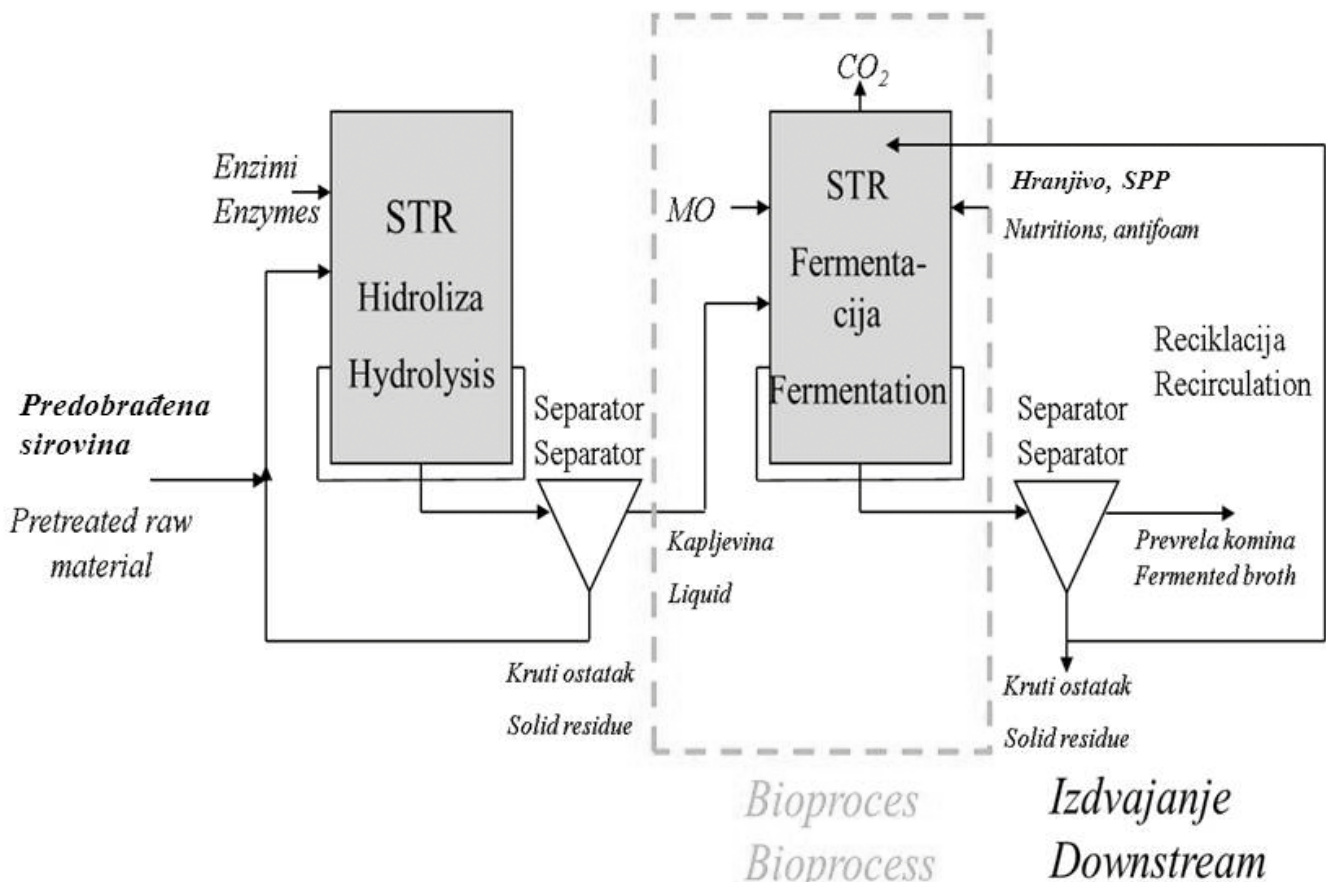
Proizvodnja bioetanola u biotehnoškome postrojenju može se voditi pomoću ovih tehnika vođenja bioprocasa: odvojena hidroliza i fermentacija (eng. separate hydrolysis and fermentation; SHF); simultana hidroliza (saharifikacija) i fermentacija (eng. simultaneous saccharification and fermentati-

on; SSF); simultana hidroliza (saharifikacija) i ko-fermentacija (eng. simultaneous saccharification and co-fermentation; SSaF) i konsolidirani bioproceni sustav (eng. consolidated bioprocessing; CBP). U daljnjem razmatranju detaljnije će se proučavati one tehnike vođenja bioprocasa koje imaju najveći potencijal za primjenu u industrijskom mjerilu.

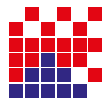
Tehnike vođenja proizvodnje bioetanola iz lignoceluloznih sirovina

Odvojena hidroliza i fermentacija

Proces odvojene hidrolize i fermentacije se s obzirom na način vođenja procesa proizvodnje bioetanola u biorektoru može voditi šaržnim ili kontinuiranim postupkom. Šaržni postupak proizvodnje bioetanola odvojenom hidrolizom i fermentacijom provodi se u dva stupnja korištenjem predobrađene lignocelulozne sirovine. U prvom stupnju predobrađena lignocelulozna sirovina podvrgava se enzimskoj hidrolizi korištenjem celulolitičkih enzima (endo- i egzo-glukanaza, β -glikozidaza), a fermentacija heksoza u tekućoj fazi provodi se u drugom stupnju korištenjem konvencionalnih kvasaca (Slika 1).



Slika 1. Pojednostavljena shema procesa odvojene enzimске hidrolize i fermentacije. (STR-bioreaktor s mješalom; MO-mikroorganizam; SPP-sredstvo za suzbijanje pjene)
Fig. 1. A simplified scheme of separate enzymatic hydrolysis and fermentation. (STR-stirred tank bioreactor; MO-microorganism)



Ova tehnika vođenja proizvodnje bioetanola iz lignoceluloznih sirovina ima industrijsku primjenu (Anonymous 2), jer omogućava kontrolu i optimalne vrijednosti parametara (npr. pH i temperatura) oba stupnja bioprocasa. Optimalne vrijednosti parametara bioprocasa ovise o: vrsti sirovine, provedenom postupku predobrade, korištenim enzimima, osobinama radnog mikroorganizama i konstrukcijskim osobinama bioreaktora (Taherzadeh i Karimi 2007; Limayem i Ricke 2012). Temperatura hidrolize sirovine se prilagođava optimalnoj temperaturi djelovanja korištenih enzima dok se u drugom stupnju optimalna temperatura prilagođava radnom mikroorganizmu. Prosječno vrijeme hidrolize je između 24-96 h, a alkoholnog vrenja 10-24 h. Ukoliko je potrebno, sastav hranjive podloge korigira se dodatkom različitih faktora rasta kako bi se ubrzao proces alkoholnog vrenja. Koncentracija šećera nakon hidrolize je relativno mala u usporedbi s proizvodnjom bioetanola iz šećernih i škrobnih sirovina. Uz šaržni, može se provoditi i kontinuirani dvostupanjski proces sa i bez reciklacije mikrobnе biomase. U literaturi je opisan relativno veliki broj dvostupanjskih postupaka, a dobivene produktivnosti procesa proizvodnje bioetanola bile su u rasponu od 0,225 do 18,3 g L⁻¹ h⁻¹. Brzine razrijeđenja u tim bioprocasima bile su u rasponu od 0,009 - 0,52 h⁻¹, a korištene su različite vrste sirovine (npr. od drvnih ostataka do ostataka iz poljoprivrede) u kombinaciji s različitim postupcima kemijske i fizikalne predobrade sirovine (Brethauer i Wyman 2010; Balat 2011; Limayem i Ricke 2012). Nadalje, tijekom tih istraživanja korištene su suspendirane i imobilizirane stanice kvasca. Proces s imobiliziranim stanicama kvasca nemaju industrijsku primjenu zbog povećanja cijene bioprocasa i smanjenja stabilnosti imobiliziranih stanica (dugotrajnim korištenjem imobiliziranih stanica dolazi do fizioloških promjena stanica). Međutim, primjena kvasaca s relativno velikom sposobnošću flokulacije našla je, kao prirodni oblik imobilizacije, primjenu u industrijskim procesima proizvodnje bioetanola (Brethauer i Wyman 2010).

Proces proizvodnje bioetanola na predobrađenim lignoceluloznim sirovinama s razrijeđenim kiselinama bez dodatka izvora ugljika proveden je pomoću flokulirajućeg soja kvasca *S. cerevisiae*. Prije procesa alkoholnog vrenja uklonjeni su inhibitori vrenja tj. hidroksimetilfurfural i furfural. Proizvodnja bioetanola je vođena kod brzina razrijeđenja u rasponu od 0,13 do 0,52 h⁻¹ uz stupanj konverzije supstrata u etanol od 0,42 - 0,44 g g⁻¹ i koncentraciju etanola u izlaznom toku bioreaktora od 25,2 - 61,8 g L⁻¹. Koncentracija stanica kvasca održavala se u intervalu 23 - 30 g L⁻¹ pomoću pritoka izvora dušika. Bioprocес je proveden i korištenjem dva bioreaktora s reciklacijom stanica kvasca iz drugog u prvi bioreaktor postrojenja. Međutim, dobiveni pokazatelji uspješnosti bioprocasa bili su na razini s rezultatima ostvarenim korištenjem samo jednog bioreaktora (Purwadi i sur. 2007; Tablica 1). Proces proizvodnje bioetanola iz drva četinjača karakterizira relativno velika produktivnost bioprocasa (oko 20 g L⁻¹ h⁻¹). Predobrada drvne biomase provedena je koncentriranom H₂SO₄, a nakon procesa neutralizacije s Ca(OH)₂ u hranjivoj podlozi su dobivene ove koncentracije šećera: 106 g L⁻¹ glukoze, 11 g L⁻¹ manoze, 3 g L⁻¹ galaktoze i 12 g L⁻¹ ksiloze. Kao dodatni izvori faktora rasta u hranjivu podlogu su dodani izvori dušika i fosfora (pepton, kukuruzna močevina, kvašćev ekstrakt, te anorganski izvori fosfora). Bioprocес je proveden pri 35 °C, pH 4-4,5 i brzini razrijeđenja 0,3 h⁻¹ uz produktivnost bioprocasa od 21 g L⁻¹

h⁻¹. Ovaj bioprocес je proveden i u cijevnim poluindustrijskim bioreaktorima pri čemu je brzina razrijeđenja smanjena na 0,2 h⁻¹ uz smanjenje produktivnosti bioprocasa na 12,6 g L⁻¹ h⁻¹. Budući da cijevne bioreaktore karakterizira gradijent koncentracije uzduž osi bioreaktora u ovim istraživanjima nije uočena pojava inhibicije supstratom ili drugim sastojkom hidrolizata lignoceluloznih sirovina (npr. furfural i hidroksimetil-furfural). Nedostaci ovog bioprocasa su korištenje koncentrirane kiseline, te visoki kapitalni i operativni troškovi procesa u industrijskom mjerilu (Tang i sur. 2006; Tablica 1). Nakon hidrolize lignoceluloznih sirovina i odvajanja čvrstog ostatka, tekuća faza sadrži značajne koncentracije šećera (osobito pentoza) koje kvasac *S. cerevisiae* ne može konvertirati u etanol. Stoga su razvijeni bioprocеси koji koriste više bioreaktorskih posuda kako bi se osigurali optimalni uvjeti za proizvodnju etanola iz pentoza. Istraživanja alkoholnog vrenja pentoza provedena su korištenjem višestupanjskih procesa s ovim radnim mikroorganizmima: *E. coli*, *K. oxytoca*, *Zymomonas mobilis* i kvasac *Pichia stipitis* (Ivančić-Šantek i sur. 2016). Dobar primjer toga je trostupanjski proces u kojem kvasci *Pichia stipitis* i *S. cerevisiae* provode mikrobnу konverziju pentoza i heksoza u etanol. Brzine razrijeđenja prilagođene su uvjetima u pojedinim stupnjevima bioprocasa da bi se ostvarila zadovoljavajuća vremena zadržavanja i optimalni uvjeti za proizvodnju etanola iz glukoze u zadnjem stupnju. Međutim, ovaj bioprocес proveden je pri vrlo malim brzinama razrijeđenja 0,027 h⁻¹ i na kemijski definiranoj hranjivoj podlozi koja je sadržavala 10 g L⁻¹ ksiloze i 40 g L⁻¹ glukoze, a produktivnosti bioprocasa su bile do 0,51 g L⁻¹ h⁻¹. Povećanjem brzine razrijeđenja smanjene su uspješnosti konverzije ksiloze u etanol za 20 % (Grootjen i sur. 1991; Tablica 1).

Sposobnost *Z. mobilis* da konvertira pentoze i heksoze u etanol iskorištena je za proizvodnju bioetanola iz lignoceluloznih sirovina. U bioreaktorima s fluidiziranim slojem korištene su imobilizirane stanice *Z. mobilis* za proizvodnju bioetanola na kiselinskom hidrolizatu ostataka riže, a ostvarene su relativno velike produktivnosti bioprocasa (šaržni 6,5 g L⁻¹ h⁻¹ odnosno kontinuirani 15,3 g L⁻¹ h⁻¹). Kontinuiranim postupkom proizvodnje bioetanola u bioreaktoru s mješalom na kemijski definiranoj podlozi s 8 g L⁻¹ glukoze i 40 g L⁻¹ ksiloze dobivene su koncentracije etanola od 20 - 22 g L⁻¹ pri brzini razrijeđenja 0,04-0,1 h⁻¹ uz produktivnost bioprocasa od 0,8 - 2,1 g L⁻¹ h⁻¹ (Lawford i sur. 1998; Tablica 1). Rezultati proizvodnje bioetanola na detoksificiranom kiselinskom hidrolizatu piljevine topole pokazali su da se u šaržnom postupku mogu ostvarivati zadovoljavajući stupnjevi konverzije supstrata u etanol. Međutim, primjenom kontinuiranog postupka usljed adaptacije radnog mikroorganizma na povećane koncentracije supstrata u podlozi zabilježeno je dodatno povećanje efikasnosti bioprocasa (Lawford i Rousseau 2002).

Bioreaktor s fluidiziranim slojem korišten je i za proizvodnju bioetanola iz kukuruznih ostataka hidroliziranih s razrijeđenom H₂SO₄. Nakon hidrolize u tekućoj fazi koncentracija glukoze iznosila je 16 g L⁻¹, a koncentracija ksiloze 68 g L⁻¹. Razrijeđivanjem i dodatkom izvora dušika i drugih faktora rasta proveden je proces alkoholnog vrenja tako pripremljene hranjive podloge (bez uklanjanja inhibitora) s genetski modificiranim *Thermoanaerobacter BG11*. Radni mikroorganizam je imobiliziran na čvrstom nosaču promjera čestica 1 - 1,5 mm, a bioprocес je proveden u bioreaktoru s fluidiziranim slojem na

70 °C i pH 7,0. Vrijeme zadržavanja hranjive podloge u bioreaktoru bilo je 2 do 3 dana. Koncentracija supstrata povećavala se postepeno kako bi se osigurala adaptacija radnog mikroorganizma na povećane koncentracije inhibitora alkoholnog vrenja u hranjivoj podlozi. Stupanj konverzije šećera u etanol

bio je u intervalu od 0,39 - 0,42 g g⁻¹, a koncentracija etanola 32,5 - 35,1 g L⁻¹. Bioproces je trajao 135 dana uz zadovoljavajuću razinu asepticnosti (Georgieva i Ahring 2007; Tablica 1). Usporedba različitih postupaka odvojene kiseline hidrolize i fermentacije prikazana je u tablici 1.

Tablica 1. Proizvodnja bioetanolu u različitim procesima odvojene kiseline hidrolize i fermentacije.

Table 1. Production of bioethanol in different separate acid hydrolysis and fermentation processes.

Hranjiva podloga; radni mikroorganizam / Culture medium; microorganism	Koncentracija šećera (g L ⁻¹) / Sugar concentration (g L ⁻¹)	Tip reaktora / Reactor type	Brzina razrijeđenja (h ⁻¹) / Dilution rate (h ⁻¹)	Koncentracija etanola (g L ⁻¹) / Ethanol concentration (g L ⁻¹)	Y _{P/S} (g g ⁻¹) / Y _{P/S} (g g ⁻¹)	Produktivnost proizvodnje etanola (g L ⁻¹ h ⁻¹) / Ethanol productivity (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Referenca / References
Hidrolizati lignoceluloznih sirovina dobiveni predobradom s razrijeđenom kiselinom (uz dodatak izvora dušika); <i>S. cerevisiae</i> / Dilute acid hydrolysate of lignocellulosic raw materials (addition of nitrogen source); <i>S. cerevisiae</i>	Glukoza: 60-140 / Glucose: 60-140	Dvostupanjski kontinuirani kemostat (N-limitacija) s recirkulacijom biomase iz drugog u prvi bioreaktor / Two stage CSTR chemostat (N limitation) with cell recirculation from second to first bioreactor	0,13-0,52	25,20 - 61,60	0,42-0,44	1,64-16,71	Purwadi i sur. (2007) / Purwadi et al. (2007)
Kemijski definirana hranjiva podloga; <i>S. cerevisiae</i> , <i>Pichia stipitis</i> / Chemically defined culture medium; <i>S. cerevisiae</i> , <i>Pichia stipitis</i>	Glukoza: 40 Ksilozo: 10 / Glucose: 40, Xylose 10	Kontinuirani proces s tri serijski povezana CSTR / Continuous process with three CSTRs in series	0,027	18,8	0,38	0,51	Grootjen i sur. (1991) / Grootjen et al. (1991)
Hidrolizati ostataka riže dobiveni predobradom s razrijeđenom kiselinom; <i>Z. mobilis</i> / Dilute acid hydrolysate of rice residues; <i>Z. mobilis</i>	Glukoza: 8 Ksilozo: 40 / Glucose: 8, Xylose 40	Kontinuirani proces s tri serijski povezana CSTR / Continuous process with three CSTRs in series	0,04-0,1	20,0-22,0	0,41-0,46	0,8-2,1	Lawford i sur. (1998) / Lawford et al. (1998)
Hidrolizati drva dobiveni dvostupanjskim procesom s razrijeđenom kiselinom (uz dodatak hranjiva); <i>S. cerevisiae</i> / Two stage dilute acid hydrolysate of wood, (addition of medium ingredients); <i>S. cerevisiae</i>	Glukoza: 106 Manoza: 11 / Glucose: 106, Mannose: 11	Jednostupanjski kontinuirani proces u cijevnom bioreaktoru / Single stage continuous process in tubular bioreactor	0,2	56,0-63,0	0,43	12,6	Tang i sur. (2006) / Tang et al. (2006)
Hidrolizati kukuruznih ostataka dobiveni predobradom s razrijeđenom kiselinom (uz dodatak hranjiva); <i>Termoanaerobacter BG111</i> / Dilute acid hydrolysate of corn residue (addition of medium ingredients); <i>Termoanaerobacter BG111</i>	Glukoza: 16 Ksilozo: 68 / Glucose: 16, Xylose 68	Jednostupanjski kontinuirani proces u bioreaktoru s fluidiziranim slojem / Single stage continuous process in fluidized bed bioreactor	0,125	32,5-35,1	0,39-0,42	4,1-4,4	Georgieva i Ahring (2007) / Georgieva and Ahring (2007)

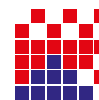
CSTR - kontinuirani bioreaktor s mješalom; Y_{P/S} - stupanj konverzije supstrata u etanol

CSTR - continuous stirred tank bioreactor; Y_{P/S} - conversion coefficient of substrate into ethanol

Proizvodnja bioetanolu iz pšeničnih ostataka hidroliziranih pomoću H₂O₂ također je provedena u bioreaktoru s fluidiziranim slojem. Nakon hidrolize tekuća faza je razrijeđena tako da koncentracije suhe tvari u hranjivoj podlozi budu u intervalu od 3-12%, a pH vrijednost je korigirana na 5.0 pomoću NaOH. Hranjiva podloga je sterilizirana i ohlađena, te hidrolizirana pomoću lignocelulitičkog multienzimskog kompleksa (Celluclast i Novozyme 188; odnos 3:1 vol/vol; 10 FPU/g celuloze). Detoksifikacijski stupanj nije proveden. Koncentracija glukoze u hranjivoj podlozi bila je u intervalu od 9 - 27 g L⁻¹,

a koncentracija ksiloze u intervalu od 3 - 14 g L⁻¹. Maksimalna koncentracija etanola na izlazu iz bioreaktora bila je 14,4 g L⁻¹, a stupanj konverzije supstrata u etanol 0,42 g g⁻¹. Konverzija glukoze u etanol bila je 90 %, a ksiloze u intervalu od 72-80 %. Zadovoljavajuća razina asepticnosti bioprocesa sačuvala se tijekom 143 dana istraživanja (Georgieva i sur. 2008).

Membranski bioreaktori su također korišteni i za proizvodnju bioetanolu iz izluženih ostataka šećerne trske (eng. bagasse). Predobrada ostataka šećerne trske provedena je na 121 °C/1 h s 1 % NaOH (uklanjanje lignina), a enzimski hidro-



liza (nakon nekoliko ispiranja obrađene sirovine) provedena je korištenjem celulaza iz *T. reesei*. Nakon enzimске hidrolize kao radni mikroorganizam za proizvodnju etanola korišten je kvasac *S. cerevisiae*. Bioproces je proveden kod različitih brzina razrijeđenja, a maksimalna produktivnost od 4,1 g L⁻¹ h⁻¹ ostvarena je pri 0,13 h⁻¹. Koncentracija glukoze, etanola i biomase u ustaljenom stanju bile su: 90 g L⁻¹, 31 g L⁻¹ i 3,8 g L⁻¹ (Ghose i Tyagi 1979; Tablica 2).

Membranski bioreaktor je korišten i za proizvodnju bioetanola na hrastovim strugotinama. Hrastove strugotine su prethodno obrađene pomoću predgrijane vodene pare (3 min / 215 °C), a da bi se smanjila koncentracija inhibitora alkoholnog vrenja dobiveni hidrolizat hrastovih strugotina dodatno je izložen postupku termalne obrade na 60 °C/120 min. Pri ulaznoj koncentraciji glukoze 180 g L⁻¹ i brzini razrijeđenja 0,22 h⁻¹ dobiveno je 77 g L⁻¹ etanola, a produktivnost bioprocasa bila je 16,9 g L⁻¹ h⁻¹ uz stupanj konverzije supstrata u etanol od 0,43 g g⁻¹. U šaržnom procesu pri početnoj koncentraciji glukoze od 170 g L⁻¹ ostvarena je koncentracija etanola od 57 g L⁻¹ nakon 210 h bioprocasa s 35 g L⁻¹ neutrošene glukoze i produktivno-

šću od 0,3 g L⁻¹ h⁻¹ (Lee i sur. 2000; Tablica 2). Recikliranjem stanica kvasca ostvareno je značajno povećanje prinosa etanola. Proizvodnja bioetanola na obrađenim ostacima smreke s recikliranjem kvaščeve biomase povećana je produktivnost za 4,5 puta u odnosu na proces bez reciklacije biomase. Predobrada je provedena s pregrijanom vodenom parom u struji SO₂ (215 °C / 5 min), a potom je provedena enzimska hidroliza bez odvajanja čvrstog ostatka. Kvasac *S. cerevisiae* izoliran iz sulfidne lužine korišten je za provođenja procesa alkoholnog vrenja, a uočeno je da ima sedam puta veću maksimalnu brzinu rasta od pekarskog kvasca pri niskim pH vrijednostima. Također je zapažena otpornost izoliranog kvasca na inhibitore alkoholnog vrenja kao što su furfural i hidroksimetil-furfural. Ukoliko se bioproces vodi bez izdvajanja čvrstog ostatka prije alkoholnog vrenja može se ostvariti ušteda u kapitalnim i operativnim troškovima. Međutim, ovakav način vođenja bioprocasa ograničen je zbog otežanog uklanjanja inhibitora prisutnih u čvrstoj fazi (Palmqvist i sur. 1998; Spindler i sur. 1987; Tablica 2). Usporedba različitih postupaka odvojene enzimске hidrolize i alkoholnog vrenja (fermentacije) prikazana je u tablici 2.

Tablica 2. Proizvodnja bioetanola u različitim procesima odvojene enzimске hidrolize i fermentacije.
Table 2. Production of bioethanol in different separate enzyme hydrolysis and fermentation processes.

Hranjiva podloga / Culture medium	Koncentracija šećera (g L ⁻¹) / Sugar concentration (g L ⁻¹)	Tip reaktora / Reactor type	Brzina razrijeđenja (h ⁻¹) / Dilution rate (h ⁻¹)	Koncentracija etanola (g L ⁻¹) / Ethanol concentration (g L ⁻¹)	Y _{PS} (g g ⁻¹) / Y _{PS} (g g ⁻¹)	Produktivnost proizvodnje etanola (g L ⁻¹ h ⁻¹) / Ethanol pro- ductivity (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Referenca / References
Vakuum uparavanjem pripremljeni enzimski hidrolizati čvrstih ostataka stabljike šećerne trske predobrađeni s NaOH (uz dodatak "jeftinog izvora dušika", CaCl ₂ , MgSO ₄) / Sugar cane bagasse pretreated with NaOH; washed solids enzymatically hydrolyzed, concentration by vacuum evaporation; (addition of "cheap nitrogen source", CaCl ₂ , MgSO ₄)	Reducirajući šećeri: 160 / Reducing sugars: 160	Jednostupanjski kontinuirani proces (CSTR) / Single stage CSTR	0,13	31	0,19	4,1	Ghose i Tyagi (1979) / Ghose and Tyagi (1979)
		Jednostupanjski kontinuirani proces (CSTR) s recikliranjem biomase / Single stage CSTR with cell recycle	0,3	58	0,36	18,3	
Vakuum uparavanjem pripremljeni enzimski hidrolizati drvnih ostataka hrasta predobrađeni eksplozijom u vodenoj pari te sterilizirani 120 min na 60 °C Steam exploded oak chips, washed solids enzymatically hydrolyzed, concentrated by vacuum evaporation, sterilization for 120 min at 60 °C	Glukoza: 180 Glucose: 180	Jednostupanjski kontinuirani proces (CSTR) s membranskim modulom / Single stage CSTR with cell retention by membrane module	0,22	77	0,43	16,9	Lee i sur. (2000) / Lee et al. (2000)
	Glukoza: 170 Glucose: 170	Jednostupanjski šaržni proces / Single stage batch	n.d.	57	0,34	0,3	
Enzimski hidrolizati drvnih ostataka smreke predobrađeni eksplozijom u vodenoj pari (uz dodatak mineralnih hranjiva) / Steam exploded spruce, whole slurry enzymatically hydrolyzed, addition of complete mineral medium salts	Glukoza: 25-50, Manoza: 10 / Glucose: 25-50, Mannose: 10	Jednostupanjski kontinuirani proces (CSTR) / Single stage CSTR	0,05	20	0,32	0,5	Palmqvist i sur. (1998) / Palmqvist et al. (1998)
			0,1	Ispiranje / Washout			
		Jednostupanjski kontinuirani proces (CSTR) s recikliranjem biomase / Single stage CSTR with cell recycle	0,1	23	0,51	2,3	

CSTR - kontinuirani bioreaktor s mješalom; Y_{PS} - stupanj konverzije supstrata u etanol

CSTR - continuous stirred tank bioreactor: Y_{PS} - conversion coefficient of substrate into ethanol

Simultana hidroliza i fermentacija

Bioprocesi u kojima se simultano provodi hidroliza i fermentacija (eng. Simultaneous Saccharification and Fermentation SSF), u jednoj bioreaktorskoj posudi (Slika 2), imaju veliki potencijal za industrijsku primjenu jer se izbjegava pojava in-

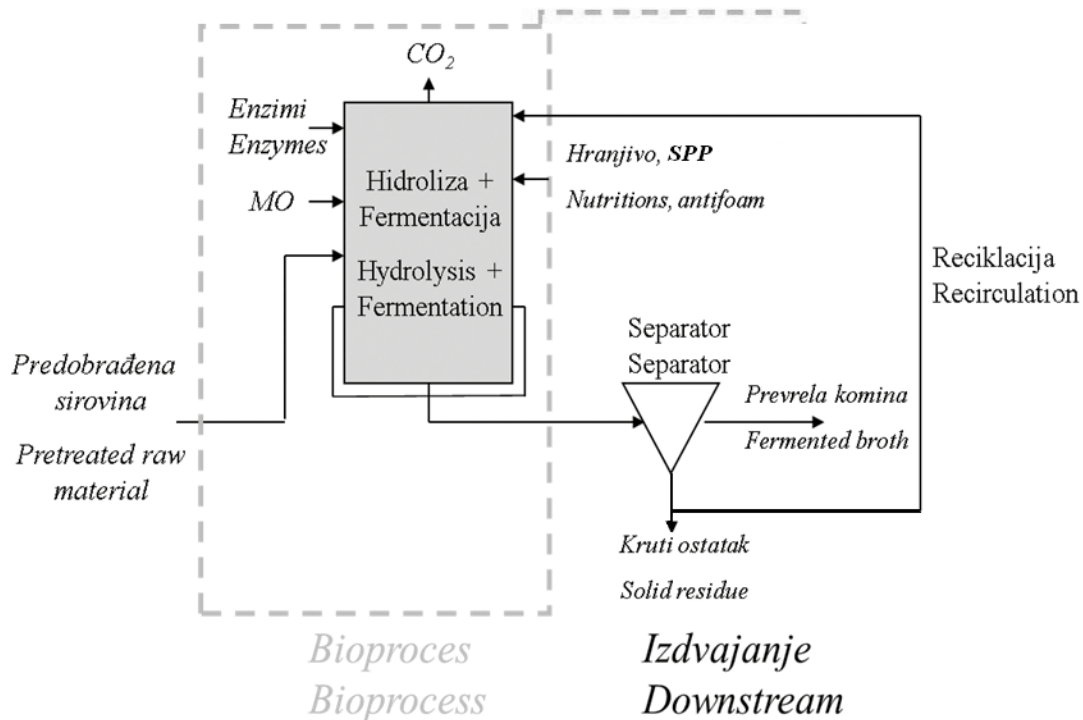
hibicije supstratom (ili drugim sastojcima hidrolizata sirovine). Nadalje, olakšano je izdvajanje i pročišćavanje proizvoda čime se može bitno poboljšati efikasnost odnosno smanjiti kapitalni i operativni troškovi bioprocasa. Osnovni nedostatak ovog postupka proizvodnje su različiti optimalni uvjeti za enzimsku hidrolizu supstrata i alkoholno vrenje. Budući da se bioprocesi

vode kod nižih temperatura od optimalne temperature za aktivnost celulitičkih enzima potrebno je primjeniti veće količine enzima za ošecerenje sirovine što poskupljuje proces proizvod-

nje. U literaturi je naveden veliki broj različitih postupaka koji su imali za cilj smanjenje troškova proizvodnje SSF procesa (Wyman 1994; Balat 2011; Limayem i Ricke 2012).

Slika 2. Pojednostavljena shema procesa simultane enzimske hidrolize i fermentacije (SSF) (MO-mikroorganizam; SPP-sredstvo za suzbijanje pjene)

Fig. 2. A simplified scheme of simultaneous enzymatic hydrolysis and fermentation process (SSF; MO-microorganism).



Usporedba različitih postupaka simultane hidrolize i fermentacije prikazana je u tablici 3.

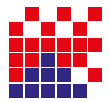
Tablica 3. Proizvodnja bioetanol u različitim procesima simultane hidrolize i fermentacije.

Table 3. Production of bioethanol in different simultaneous hydrolysis and fermentation processes.

Hranjiva podloga / Culture medium	Koncentracija šećera (g L ⁻¹) / Sugar concentra- tion (g L ⁻¹)	Tip reaktora / Reactor type	Brzina razrijeđenja (h ⁻¹) / Dilution rate (h ⁻¹)	Koncentracija etanola (g L ⁻¹) / Ethanol concentra- tion (g L ⁻¹)	Y _{PS} (g g ⁻¹) / Y _{PS} (g g ⁻¹)	Produktivnost proizvodnje eta- nola (g L ⁻¹ h ⁻¹) / Ethanol produc- tivity (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Referenca / References
Hidrolizati stabljike šećerne trske dobiveni predobrađom s razrijeđenom kiselinom / Sugar cane bagasse diluted acid hydrolysates	150	Jednostupanjski šaržni proces / Single stage batch process	-	51,7	0,34	0,94	Ferreira i sur. (2010) / Ferreira et al. (2010)
Hidrolizati kukuruzne stabljike do- biveni predobrađom s SO ₂ / Corn stover SO ₂ pretreated hydroly- sates	40	Jednostupanjski šaržni proces / Single stage batch process	-	18	0,45	0,225	Öhgren i sur. (2007) / Öhgren et al (2007)
Papirni mulj/ Paper sludge	82 120	Jednostupan- jski kontinuirani proces (pritok supstrata u 12 h intervalima) / Single stage CSTR with 12 h feed intervals	0,01	38 50	0,46 0,38	0,42 0,5	Fan i sur. (2008) / Fan et al. (2008)
Cjeloviti hidrolizati kukuruznih vlakana dobivenih jednostupanjs- kom predobrađom s razrijeđenom kiselinom / Whole slurry of one stage dilute acid pretreated corn fibers	90	Kontinuirani pro- ces s tri serijski povezana CSTR / Three CSTRs in series	0,009	40	0,44	0,36	Schell sur. (2007) / Schell et al (2007)

CSTR - kontinuirani bioreaktor s mješalom; Y_{PS} - stupanj konverzije supstrata u etanol

CSTR - continuous stirred tank bioreactor: Y_{PS} - conversion coefficient of substrate into ethanol



Šaržni proces simultane hidrolize i fermentacije izlužene stabiljike šećerne trske (eng. bagasse) proveden je korištenjem genetski modificiranih stanica *S. cerevisiae* i celulaza iz *Trichoderma reesei*. Zadržavanjem usitnjenih ostataka šećerne trske 40 min na 121 °C u otopini 1 % H₂SO₄ i 30 min na 121 °C u otopini 4 % NaOH provedena je predobrada odnosno priprema hranjive podloge za proces simultane hidrolize i fermentacije. Koncentracija celuloze bila je 150 g L⁻¹, a celulazna aktivnost je bila 25 FPU po gramu celuloze na početku bioprocasa. Maksimalna ostvarena koncentracija etanola bila je 51.7 g L⁻¹, a produktivnost 0,94 g L⁻¹ h⁻¹ (Ferreira i sur. 2010; Tablica 3). Sličan sustav predobrade sirovine korišten je i za proizvodnju bioetanola iz kukuruzovine. Predobrada usitnjenih ostataka kukuruzovine provedena je s 3 % SO₂ na 150 °C / 5 min. Simultana hidroliza i fermentacija provedena je s 40 g L⁻¹ celuloze u 15 L bioreaktoru s mješalom pomoću kvasca *S. cerevisiae* pri celulaznoj aktivnosti (cellulase NS 50013 Novozymes) 10 FPU po gramu celuloze. Maksimalna ostvarena produktivnost bila je 0,225 g L⁻¹ h⁻¹ uz koncentraciju etanola od 18 g L⁻¹ nakon 80 sati procesa šaržne simultane hidrolize i fermentacije (Öhgren i sur. 2007). Kontinuirana simultana hidroliza i fermentacija provedena je korištenjem *S. cerevisiae* D5A zajedno s celulazama. Zadržavanjem usitnjenog (0,05 mm) drveta bjelogorice 10 s na 220 °C u otopini 1 % sulfatne kiseline proveden je proces predobrade lignocelulozne sirovine. Koncentracija celuloze na ulazu bila je u intervalu 5 - 60 g L⁻¹, a celulazna aktivnost u intervalu 5 - 25 FPU po gramu celuloze. Pri koncentraciji celuloze na ulazu od 61 g L⁻¹ dodano je 12 FPU po gramu celuloze, te je brzina razrijeđenja bila 0,02 h⁻¹. Koncentracija etanola na izlazu bila je 21 g L⁻¹, a produktivnost 0,41 g L⁻¹ h⁻¹ (South i sur. 1993).

Slični sustav korišten je i za proizvodnju bioetanola iz pulpe papira. Da bi proces bio isplativ s obzirom na troškove izdvajanja etanola potrebno je dobiti koncentracije etanola veće od 40 g L⁻¹ u izlaznom toku bioreaktora. Nadalje, potrebno je smanjiti viskoznost suspenzije u bioreaktoru da bi se osiguralo efikasno miješanje hranjive podloge. Stoga je izabran kontinuirani proces s brzinom razrijeđenja 0,01 h⁻¹ i koncentracijom celuloze od 82 g L⁻¹, te je dodano 15-20 FPU celulaza po gramu celuloze. Ostvarena je 92 % konverzija celuloze u etanol uz izlaznu koncentraciju etanola od 42 g L⁻¹ i produktivnost 0,42 g L⁻¹ h⁻¹. Međutim, povećanje ulazne koncentracije celuloze na 120 g L⁻¹ i smanjenje koncentracije celulaza na 15 FPU/g celuloze rezultirala je smanjenjem stupnja konverzija celuloze u etanol na 0,38 g g⁻¹ (Fan i sur. 2003; Tablica 3).

Testiranje proizvodnje bioetanola u bioreaktoru od 9 m³ provedeno je pri brzini razrijeđenja 0,009 h⁻¹ i vremenu zadržavanja 36 h. Parametri proizvodnje su optimirani s ciljem dobivanje 40 g L⁻¹ etanola u izlaznom toku bioreaktora. Međutim, tijekom bioprocasa došlo je do kontaminacije s bakterijama mliječne kiseline, te je zapaženo smanjenje koncentracije arabinoze s 25 na 2 g L⁻¹. Da bi se spriječila kontaminacija svakih 12 h tijekom bioprocasa dodano je 10 mg L⁻¹ penicilina. Nakon prevladavanja kontaminacije ostvarene su koncentracije etanola od 50 g L⁻¹ u izlaznom toku. Pojava kontaminacije ukazala je na problem radnog mikroorganizma koji može provesti samo konverziju heksoza u etanol. Na osnovu rezultata ovog istraživanja vidljivo je da radni mikroorganizam mora biti sposoban metabolizirati sve produkte hidrolize lignoceluloznih sirovina u etanol. Da bi se to ostvarilo potrebno je odvojiti proces hidrolize i alkoholnog vrenja kako bi se spriječila pojava kontamina-

cije tijekom procesa hidrolize odnosno radni mikroorganizam treba biti otporan na povećane koncentracije inhibitora procesa alkoholnog vrenja (South i sur. 1995; Philippidis i Hatzis 1997, Schell i sur. 2007). Heterogenost hranjive podloge s velikim koncentracijama suhe tvari supstrata uzrokuje smanjenje prijenosa mase zbog čega se procesi hidrolize i alkoholnog vrenja ne provode u optimalnim uvjetima (npr. pH i temperatura). Mala homogenost sustava tijekom procesa simultane hidrolize i fermentacije u bioreaktoru može se izbjeći korištenjem bioreaktora za provođenje bioprocasa na čvrstim (ili polučvrstim) supstratima. Bioreaktori za bioprocese na čvrstim (ili polučvrstim) supstratima podijeljeni su u ove četiri skupine: bioreaktori s pliticama, nasutim i fluidiziranim slojem i rotirajući bubanj bioreaktori. Najefikasnije miješanje čvrstog (ili polučvrstog) supstrata ostvaruje se u rotirajućim bubanj bioreaktorima čija učinkovitost se može dodatno poboljšati ugradnjom mješala oblika pužnice, heliksa ili lopatica. Prednost bioprocasa provedenih u ovom tipu bioreaktora je značajno manji utrošak energije u odnosu na bioreaktore s mješalom, a nedostatak otežana kontrola parametara bioprocasa (Mitchell i sur. 2006).

Jedna od mogućnosti smanjenja troškova procesa simultane hidrolize i fermentacije je primjena združenih kultura mikroorganizama kvasca *S. cerevisiae* i plijesni *Fusarium oxysporum* koja proizvodi celulaze i hemicelulaze. Međutim, primjenom ove združene kulture mikroorganizama dobivene su relativno male koncentracije etanola (Mamma i sur. 1996). Nadalje, termotolerantni kvasac *Kluyveromyces marxianus* omogućava vođenje procesa alkoholnog vrenja na 42 - 43°C (Ballesteros i sur. 2004), a hidroliza celuloze može se uspješno provesti primjenom nepročišćene prevrele podloge na kojoj je rasla plijesan *Trichoderma reesei* čime se dodatno mogu smanjiti troškovi proizvodnje bioetanola (Wyman 1994). Dodatna mogućnost kod postupka simultane hidrolize i fermentacije je postupak simultane hidrolize i kofermentacije (eng. simultaneous saccharification and co-fermentation, SSCF) koji je tehnološki zahtjevniji, ali ekonomski isplativiji postupak proizvodnje bioetanola od prethodno navedenih postupaka proizvodnje. Istovremena konverzija pentoza i heksoza u etanol u jednom bioreaktoru smanjuje mogućnost kontaminacije, ali i kapitalne troškove bioprocasa (Cardona i Sanchez 2007; Balat 2011; Limayem i Ricke 2012).

Kvasac *Pichia stipitis* ima sposobnost da potpuno konvertira glukozu i ksilozu u etanol pri malim brzinama razrijeđenja u kontinuiranom postupku, a produktivnost bioprocasa iznosi samo 0,51 g L⁻¹ h⁻¹. Postupak simultane hidrolize i kofermentacije proučavan je i sa združenim kulturama dvaju mikroorganizama kao npr. *Saccharomyces cerevisiae* i *Pichia stipitis* (Grootjen i sur. 1990; Srilekha Yadav i sur. 2011), *Zymomonas mobilis* i *Pichia stipitis* (Fu i sur. 2009), *Zymomonas mobilis* i *Pachysolen tannophilus* (Fu i Peiris 2008) itd. Kod odabira mikroorganizama za uzgoj u združenoj kulturi važno je da odabrani mikroorganizmi rastu u sličnim uvjetima s obzirom na temperaturu bioprocasa i pH podloge što ograničava izbor mikroorganizama (Srilekha Yadav i sur. 2011). Kod združene kulture bakterija *Clostridium thermocellum* (proizvodi celulaze i prevodi glukozu u etanol) i *Clostridium thermosaccharolyticum* (fermentira pentoze) učinkovitost bioprocasa je značajno manja u usporedbi s kvascima zbog inhibicije rasta s etanolom i drugim proizvodima metabolizma (npr. octena i mliječna kiselina; Wyman 1994). Genetički modificirani mikroorganizmi mogu biti alternativa združenim

mikrobnim kulturama. Rast kvasca *S. cerevisiae* i bakterije *Z. mobilis* na pentozama omogućen je heterolognom ekspresijom gena za asimilaciju pentozama. Tijekom kontinuiranog postupka proizvodnje bioetanola s imobiliziranim stanicama rekombinantnog soja *Z. mobilis* u bioreaktoru s fluidiziranim slojem produktivnost bioprocasa je iznosila 6,5 - 8,6 g L⁻¹ h⁻¹. Međutim, na kraju bioprocasa u podlozi zaostaju značajne količine neprevrele ksiloze (Brethauer i Wyman 2010).

Integrirani sustavi za proizvodnju bioetanola

U integriranom sustavu za proizvodnju bioetanola iz lignoceluloznih sirovina, tzv. konsolidiran bioproceni sustav (eng. consolidated bioprocessing, CBP), biosinteza celulaza, oštećenje prethodno obrađene lignocelulozne biomase i fermentacija šećera u etanol provodi se samo s jednim mikroorganizmom. Glavni nedostatak ovog koncepta proizvodnje bioetanola je činjenica da još uvijek nije pronađen dovoljno učinkovit mikroorganizam koji ima sve potrebne fiziološke i tehnološke karakteristike. Međutim, s ekonomskog stajališta predloženi koncept je najučinkovitiji sustav za proizvodnju bioetanola. Fiziološke karakteristike mikroorganizama koji se već koriste u proizvodnji bioetanola nastoje se poboljšati primjenom tehnika genetičkog inženjerstva. Tako se npr. mikroorganizmima s adekvatnim fermentacijskim karakteristikama dodaju celulozitička i/ili hemicelulozitička aktivnost, a mikroorganizmima s visokom celuloznom aktivnošću poboljšavaju se fermentacijska svojstva. U kvascu *S. cerevisiae* ekspimirani su geni za metabolizam ksiloze i hemicelulozitički enzimi. Rekombinantni soj kvasca raste na hidrolizatu rižine slame bez dodatka celulozitičkih enzima i detoksifikacije podloge. Produktivnost proizvodnje bioetanola ovog soja kvasca iznosi samo 0,114 g L⁻¹ h⁻¹ (Sakamoto i sur. 2012). Zbog sposobnosti konverzije pentozama (ksiloze) koriste se i genetski modificirani sojevi kvasca *Pachysolen tannophilus*, *Pichia stipitis* i *Candida shehatae*. Međutim, zbog GRAS (eng. generally regarded as safe) statusa *S. cerevisiae* ima prednost u odnosu na prethodno navedene kvasce, a osobito za industrijsku proizvodnju bioetanola. Termofilna anaerobna bakterija *Clostridium thermocellum* proizvodi celulaze i fermentira glukozu u etanol uz relativno mali prinos etanola. Poboljšani rekombinantni soj *C. thermocellum* proizvodi i do 60 g L⁻¹ etanola, ali to je još uvijek značajno manje u odnosu na kvasac *S. cerevisiae* (Lynd i sur. 2005; Svetlitchnyi i sur. 2013). Primjenom tehnika genetičkog inženjerstva poboljšana je celulozitička aktivnost visokoproduktivnih rekombinantnih sojeva bakterija *E. coli*, *K. oxytoca* i *Z. mobilis* i kvasca *S. cerevisiae* (Lawford i Rousseau 2002; Mohagheghi i sur. 2002; Stevenson i Weimer 2002; Demain i sur. 2005; Lynd i sur. 2005; Wood i sur. 2005; Panagiotou i sur. 2006; Cardona i Sanchez 2007; Balat 2011; Limayem i Ricke 2012; Zhao i sur. 2012).

Zaključci

Na osnovu ovog razmatranja vidljivo je da se proces proizvodnje bioetanola iz lignoceluloznih sirovina može provesti pomoću različitih tehnika vođenja bioprocasa kao što su npr. odvojeni proces hidrolize i fermentacije, simultana hidroliza i fermentacija, simultana hidroliza i kofermentacija

ili konsolidirani bioproceni sustav. Primjenom tehnike odvojene hidrolize i fermentacije mogu se i u industrijskom mjerilu dobiti zadovoljavajući pokazatelji uspješnosti proizvodnje bioetanola iz lignoceluloznih sirovina. Kontinuiranim postupkom proizvodnje bioetanola uz optimalnu brzinu razrijeđenja mogu se izbjeći problemi vezani uz povećanje viskoznosti i neadekvatnu homogenost hranjivih podloga s velikim koncentracijama suhe tvari lignoceluloznih sirovina što omogućava uspješno vođenje tih bioprocasa. Imobilizacijom stanica kvasca i njihovom reciklacijom povećava se produktivnost procesa proizvodnje bioetanola. Dodatno je smanjena mogućnost pojave inhibicije β-galaktozidaze s celobiozom zbog kontinuiranog odvođenja iskorištene i dovođenja svježe hranjive podloge. Za daljnji razvoj procesa proizvodnje bioetanola iz lignoceluloznih sirovina najveći potencijal ima tehnika simultane hidrolize i fermentacije zbog smanjene mogućnosti pojave inhibicije supstratom (ili drugim sastojcima hidrolizata sirovina) odnosno smanjenja kapitalnih troškova bioprocasa. Kod primjene cijevnih bioreaktora u procesu proizvodnje bioetanola osobito je vidljivo smjernenje pojave inhibicije što smanjuje troškove proizvodnje bioetanola zbog toga što nije potreban proces uklanjanja inhibitora. Međutim, potrebno je ukazati na potrebu daljnjeg istraživanja procesa proizvodnje bioetanola iz lignoceluloznih sirovina s ciljem razvoja integriranog sustava za proizvodnju bioetanola koji uključuje simultanu hidrolizu i fermentaciju pentozama i heksoza uz energetski i ekonomski učinkovit proces izdvajanja i pročišćavanja bioetanola. Ove spoznaje trebale bi u konačnici omogućiti daljnji razvoj industrijskih integriranih procesa proizvodnje bioetanola temeljenih na korištenju lignoceluloznih sirovina.

Zahvala

Ovaj rad je financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom "Proizvodnja bioetanola i biokemikalija iz otpadnih poljoprivrednih lignoceluloznih sirovina na principima ekološke i ekonomske održivosti" (SPECH-LRM; 9158).

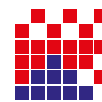
Literatura References

Anonymous 1 (2009) Directive 2009/28/EC of the European Parliament and of the Council of 23 April 2009 on the promotion of the use of energy from renewable sources and amending and subsequently repealing Directives 2001/77/EC and 2003/30/EC, *Official Journal of the European Union*, L 140/16, 5. 6. 2009.

Anonymous 2 European Biofuels Technology Platform (EBTP). URL: http://www.biofuelstp.eu/cellulosic_ethanol.html#crestino (pristupljeno 20.05.2016.).

Bai F.W., Anderson W.A., Moo-Young M. (2008) Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology Advances*, 26 89-105.

Ballesteros M., Oliva J. M., Negro J. M., Manzanares M. J., Ballesteros P. I. (2004) Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Process Biochemistry*, 39 1843-1848.



- Balat M. (2011) Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. *Energy Conversion and Management*; 52 858-875
- Bothast R. J., Schlicher M. A. (2005) Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67 19-25.
- Brethauer S., Wyman C. E. (2010) Review: continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. *Bioresource Technology*, 101 4862-4874.
- Cardona C. A., Sanchez O. J. (2007) Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. *Bioresource Technology* 98 2415-2427.
- Demain A.L., Newcomb M., Wu J.H.D. (2005) Cellulase, clostridia, and ethanol. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69 124-154.
- Demirbas A. (2007) Progress and recent trends in biofuels. *Progress in Energy and Combustion Science*, 33 1-18.
- Erdei B., Galbe M., Zacchi G. (2013) Simultaneous saccharification and co-fermentation of whole wheat in integrated ethanol production. *Biomass and Bioenergy*, 56 506-514.
- Fan Z.L., South C., Lyford K., Munsie J., van Walsum P., Lynd L.R. (2003) Conversion of paper sludge to ethanol in a semicontinuous solids-fed reactor. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 26 93-101.
- Ferreira V., Faber M.O., Mesquita S.S., Pereira N. Jr. (2010) Simultaneous saccharification and fermentation process of different cellulosic substrates using a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* harbouring the β -glucosidase gene. *Electronic Journal of Biotechnology*, 13 154-160.
- Fu N., Peiris P (2008) Co-fermentation of a mixture of glucose and xylose to ethanol by *Zymomonas mobilis* and *Pachysolen tannophilus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24 1091-1097.
- Fu N., Peiris P., Markham J., Bavor J. (2009) A novel co-culture process with *Zymomonas mobilis* and *Pichia stipitis* for efficient ethanol production on glucose/xylose mixtures. *Enzyme and Microbial Technology*, 45 210-217.
- Georgieva T.I., Ahring B.K. (2007) Evaluation of continuous ethanol fermentation of dilute-acid corn stover hydrolysate using thermophilic anaerobic bacterium *Thermoanaerobacter* BG1L1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77 61-68.
- Georgieva T.I., Mikkelsen M.J., Ahring B.K. (2008) Ethanol production from wetexploded wheat straw hydrolysate by thermophilic anaerobic bacterium *Thermoanaerobacter* BG1L1 in a continuous immobilized reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 145 99-110.
- Ghose T.K., Tyagi R.D. (1979) Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysate 1: batch versus continuous systems. *Biotechnology and Bioengineering*, 21 1387-1400.
- Gregg D.J., Boussaid A., Sandler J.N. (1998) Techno-economic evaluations of a generic wood-to-ethanol process: effect of increased cellulose yields and enzyme recycle. *Bioresource Technology*, 63 7-12.
- Grootjen D.R.J., Meijlink L.H.H.M., van der Lans R.G.J.M., Luyben K.Ch.A.M. (1990) Cofermentation of glucose and xylose with immobilized *Pichia stipitis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*, 12 860-864.
- Grootjen D.R.J., Jansen M.L., Vanderlans R., Luyben K. (1991) Reactors in series for the complete conversion of glucose xylose mixtures by *Pichia stipitis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*, 13 828-833.
- 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 in Biotechnology*, 24 549-556.
- Hendriks A.T.W.M., Zeeman G. (2009) Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 100 10-18.
- Huang H. J., Ramaswamy S., Tschirner U. W., Ramarao B. V. (2008) A review of separation technologies in current and future biorefineries. *Separation and Purification Technology*, 62 1-21.
- Ivančić Šantek M., Miškulin E., Beluhan S., Šantek B. (2016) Novi trendovi u proizvodnji etanola kao biogoriva. *Kemija u Industriji*, 65 25-38.
- Jönsson L. J., Alriksson B., Nilvebrant N. O. (2013) Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnology for Biofuels*, 6 16-26.
- Lawford H.G., Rousseau J.D., Mohagheghi A., McMillan J.D. (1998) Continuous culture studies of xylose-fermenting *Zymomonas mobilis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 70-72 353-367.
- Lawford H.G., Rousseau J.D. (2002) Performance testing of *Zymomonas mobilis* metabolically engineered for co-fermentation of glucose, xylose, and arabinose. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 98-100 429-448.
- Lee W.G., Park B.G., Chang Y.K., Chang H.N., Lee J.S., Park S.C. (2000) Continuous ethanol production from concentrated wood hydrolysates in an internal membrane-filtration bioreactor. *Biotechnology Progress*, 16 302-304.
- Limayem A., Ricke S. C. (2012) Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Progress in Energy and Combustion Science*, 38 449-467.
- Lynd L.R. (1996) Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: technology, economics, the environment and policy. *Annual Review of Energy and the Environment*, 21 403-465.
- Lynd L.R., Weimer P.J., van Zyl W.H., Pretorius I.S. (2002) Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66 506-557.
- Lynd L., McBride W. Zyl, J., Laser M. (2005) Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Current Opinion in Biotechnology*, 16 577-583.
- Mamma D., Koullas D., Fountoukidis G., Kekos D., Marcris B. J., Koukios E. (1996) Bioethanol from sweet sorghum: simultaneous saccharification and fermentation of carbohydrates by a mixed microbial culture. *Process Biochemistry*, 31 377-381.
- Mitchell D. A., Krieger N., Berović M. (ed.) (2006) Solid-State Fermentation, Bioreactors, Fundamentals of Design and Operation. Springer, Heidelberg, Germany.
- Mohagheghi A., Evans K., Chou Y.C., Zhang M. (2002) Cofermentation of glucose, xylose, and arabinose by genomic DNA-integrated xylose/arabinose fermenting strain of *Zymomonas mobilis* AX101. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 98-100 885-898.



- Mussatto S. I., Dragone G., Guimarães P. M., Silva J. P. A., Carneiro L. M., Roberto I. C., Teixeira J. A. (2010) Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. *Biotechnology Advances*, 28 817-830.
- Nigam P. S., Singh A. (2011) Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science*, 37 52-68.
- Ogier J.C., Ballerini D., Leygue J.P., Rigal L., Pourquie J. (1999) Ethanol production from lignocellulosic biomass. *Oil & Gas Science and Technology*, 54 67-94.
- Öhgren K. L.U., Bura R., Lesnicki G., Saddler J., Zacchi G. L.U. (2007) A comparison between simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation using steam-pretreated corn stover. *Process Biochemistry*, 42 834-839.
- Olsson L., Hahn-Hägerdal B. (1996) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. *Enzyme and Microbial Technology*, 18 312-331.
- Palmqvist E., Galbe M., Hahn-Hägerdal B. (1998) Evaluation of cell recycling in continuous fermentation of enzymatic hydrolysates of spruce with *Saccharomyces cerevisiae* and on-line monitoring of glucose and ethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50 545-551.
- Panagiotou G., Christakopoulos P., Grotkjaer T., Nielsen J., Olsson L. (2006) Engineering of the redox imbalance of *Fusarium oxysporum* enables anaerobic growth on xylose. *Metabolic Engineering*, 8 474-482.
- Philippidis G.P., Hatzis C. (1997) Biochemical engineering analysis of critical process factors in the biomass-to-ethanol technology. *Biotechnology Progress*, 13 222-231.
- Purwadi R., Brandberg T., Taherzadeh M.J. (2007) A possible industrial solution to ferment lignocellulosic hydrolysate to ethanol: continuous cultivation with flocculating yeast. *International Journal of Molecular Sciences*, 8 920-932.
- Sakamoto T., Hasunuma T., Hori Y., Yamada R., Kondo A. (2012) Direct ethanol production from hemicellulosic materials of rice straw by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of hemicellulolytic enzymes on the surface of xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Journal of Biotechnology*, 158 203-210.
- Sánchez O. J., Cardona C. A. (2008) Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology*, 99 5270-5295.
- Schell D.J., Dowe N., Ibsen K.N., Riley C.J., Ruth M.F., Lumpkin R.E. (2007) Contaminant occurrence, identification and control in a pilot-scale corn fiber to ethanol conversion process. *Bioresource Technology*, 98 2942-2948.
- Spindler D.D., Wyman C.E., Mohagheghi A., Grohmann K. (1987) Thermotolerant yeast for simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to ethanol. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 17 279-293.
- South C.R., Hogsett D.A., Lynd L.R. (1993) Continuous fermentation of cellulosic biomass to ethanol. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 39 587-600.
- South C.R., Hogsett D.A.L., Lynd L.R. (1995) Modeling simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose to ethanol in batch and continuous reactors. *Enzyme and Microbial Technology*, 17 797-803.
- Srilekha Yadav K., Naseeruddin S., Sai Prashanthi G., Saiteesh L., Venkateswar Rao L. (2011) Bioethanol fermentation of concentrated rice straw hydrolysate using co-culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipites*. *Bioresource Technology*, 102 6473-6478.
- Stevenson D.M., Weimer P.J. (2002) Isolation and characterization of a *Trichoderma* strain capable of fermenting cellulose to ethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59 721-726.
- Svetlitchnyi V.A., Kensch O., Falkenhan D.A., Korsevska S.G., Lippert N., Prinz M., Sassi J., Schickor A., Curvers S. (2013) Single-step ethanol production from lignocellulose using novel extremely thermophilic bacteria. *Biotechnology for Biofuels*, 6 31.
- Taherzadeh M.J., Karimi K. (2007) Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *BioResources*, 2 472-499.
- Tang Y., An M., Liu K., Nagai S., Shigematsu T., Morimura S., Kida K. (2006) Ethanol production from acid hydrolysate of wood biomass using the flocculating yeast *Saccharomyces cerevisiae* strain KF-7. *Process Biochemistry*, 41 909-914.
- Taylor N. G. (2008) Cellulose biosynthesis and deposition in higher plants. *New Phytologist*, 178 239-252.
- Wingren A., Galbe M., Zacchi G. (2003) Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. *Biotechnology Progress*, 19 1109-1117.
- Wood B.E., Yomano L.P., York S.W., Ingram L.O. (2005) Development of industrial-medium-required elimination of the 2,3-butanediol fermentation pathway to maintain ethanol yield in an ethanologenic strain of *Klebsiella oxytoca*. *Biotechnology Progress*, 21 1366-1372.
- Wyman C.E., Decker S.R., Himmel M.E., Brady J.W., Skopec C.E., Viikari L. (2004) Hydrolysis of cellulose and hemicellulose. U: Dumitriu S. (ed.): Polysaccharides: structural diversity and functional versatility, str. 995-1033, Marcel Dekker, Inc., New York, USA.
- Wyman C.E. (2007) What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol. *Trends in Biotechnology*, 25 153-157.
- Wyman C.E., Dale B.E., Elander R.T., Holtzapple M., Ladisch M.R., Lee Y.Y., Mitchinson C., Saddler J.N. (2009) Comparative sugar recovery and fermentation data following pretreatment of poplar wood by leading technologies. *Biotechnology Progress*, 25 333-339.
- Wyman C. E. (1994) Ethanol from lignocellulosic biomass: technology, economics, and opportunities, *Bioresource Technology*, 50 3-15.
- Zhao X.Q., Zi L.H., Bai F.W., Lin H.L., Hao X.M., Yue G.J., Ho N. W. Y. (2012) Bioethanol from lignocellulosic biomass. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*, 128 25-51.
- Yu Z.S., Zhang H.X. (2004) Ethanol fermentation of acid-hydrolyzed cellulosic pyrolysate with *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*, 93 199-204.